

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE
PROF. DR. REINHARD ANDREESEN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

Regulation der T-Zellaktivität durch Milchsäure

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Julia Ammer**

2009

**AUS DER ABTEILUNG
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE
PROF. DR. REINHARD ANDREESEN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

Regulation der T-Zellaktivität durch Milchsäure

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Julia Ammer**

2009

Dekan:

Prof. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Marina Kreutz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Anja Bosshoff

Tag der mündlichen Prüfung:

30. März 2010

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:
“Inhibitory effect of tumor cell derived lactic acid on human T-cells”
(Blood, 2007; Vol 1; 109 (9): 3812-9).

Abkürzungsverzeichnis

2-DG	: 2-Deoxyglukose
Abb.	: Abbildung
AK	: Antikörper
APC	: Antigenpräsentierende Zellen
CD	: „Cluster of Differentiation“
CFSE	: „Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester“
CINN	: Zimtsäure (“ α -Cyano-4-Hydroxycinnamate”)
CO ₂	: Kohlendioxid
COX-2	: Cyclooxygenase-2
cpm	: “Counts” pro Minute
CSF	: Kolonie-stimulierender Faktor
CTL	: Zytotoxische T-Lymphozyten
d	: Tag
DC	: Dendritische Zellen
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	: „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
FACS	: “Fluorescence Activated Cell Sorting”
FCS	: Fötales Kälberserum
FDG-PET	: 18-Fluoro-Deoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie
FITC	: Fluoresceinisoithiocyanat
H ₂ O	: Wasser
HCl	: Salzsäure
HIF-I	: Hypoxia inducible factor-I
HLA	: Humanes Leukozyten Antigen
hrs	: Stunden
IDO	: Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	: Interferon gamma
Ig	: Immunglobulin
IL	: Interleukin
Ko.	: Kontrollansatz
LDH	: Laktatdehydrogenase

MCT	: Monocarboxylattransporter
MHC	: Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
MLR	: Gemischte Lymphozytenreaktion („Mixed Lymphocyte Reaction“)
MS	: Milchsäure
NOS	: NO-Synthase
Ox. ac.	: Oxamat („Oxamic acid“)
PBS	: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („Phosphate Buffered Solution“)
PCR	: Polymerasekettenreaktion („Polymerase chain reaction“)
PE	: Phycoerythrin
PFA	: Paraformaldehyd
pH	: „Potentia Hydrogenii“ (pH-Wert)
PMA	: Phorbol-Myristat-Acetat
rDNA	: Ribo-Desoxyribonukleinsäure
RNA	: Ribonukleinsäure
Rpm	: „Rotations per minute“
SEM	: Standardfehler des Mittelwerts („Standard Error of the Mean“)
stim.	: stimuliert
TCGF	: T-Zellwachstumsfaktor („T-cell growth factor“)
TCR	: T-Zellrezeptor („T-cell receptor“)
TGF- β	: Transforming-growth-factor- β
VEGF	: „Vascular-Endothelial-Growth-Factor“
vs	: versus

1 Einleitung

1.1	Immunsystem – der Ursprung der T-Zellen	10
1.2	Rolle der T-Zellen bei Infektionen und Tumorabwehr	11
1.3	„Immun Escape“-Mechanismen von Tumoren	13
1.4	Tumormetabolismus und Immunmodulation	14
1.5	Ursachen des veränderten Glukosemetabolismus in Tumorzellen	15
1.6	Diagnostik: Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET)	17
1.7	Glukosemetabolismus und Immunmodulation	18
1.8	Zielsetzung	19

2 Materialien und Methoden

2.1	Zellkultur	20
2.1.1	Kultivierung von Tumorzelllinien	20
2.1.2	Gewinnung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten und reifen dendritischen Zellen	21
2.2	Funktionelle Analysen	22
2.2.1	Zytotoxische T-Lymphozyten	22
2.2.1.1	Proliferationsbestimmung mit [³ H]-Thymidin	22
2.2.1.2	Apoptosebestimmung mit Durchflusszytometrie	23
2.2.2	Jurkat-T-Zellen	24
2.2.2.1	Proliferationsbestimmung mit [³ H]-Thymidin	24
2.2.2.2	Apoptosebestimmung mit Durchflusszytometrie	25
2.2.3	Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Monocarboxylat- transportern auf T-Zellen	25
2.2.3.1	Jurkat-T-Zellen	25
2.2.3.2	Zytotoxische T-Lymphozyten	26
2.2.4	Bestimmung von Monocarboxylattransportern auf T-Zellen mittels Western Blot	26
2.2.5	Proliferationsbestimmung mittels CFSE-Färbung bei Jurkat-T-Zellen	27
2.2.6	Gemischte Lymphozytenreaktion	28
2.2.7	Polymerasekettenreaktion	29

2.2.8	Bestimmung von IL-2 bei Jurkat-T-Zellen mit ELISA	31
2.2.9	Proliferation unter Einfluss von IL-2 bei Jurkat-T-Zellen	31
2.2.10	Bestimmung des Laktatgehaltes in Zellüberständen	32

3 Ergebnisse **33**

3.1	Proliferationshemmung durch den Einfluss von Milchsäure	33
3.1.1	[³ H]-Thymidininkorporation von zytotoxischen T-Lymphozyten	33
3.1.2	[³ H]-Thymidininkorporation von Jurkat-T-Zellen	35
3.2	Proliferationsmessung mittels CFSE-Färbung bei Jurkat-T-Zellen	36
3.3	Apoptoseinduktion durch den Einfluss von Milchsäure	37
3.3.1	Apoptose bei zytotoxischen T-Lymphozyten	37
3.3.2	Apoptose bei Jurkat-T-Zellen	39
3.4	Gemischte Lymphozytenreaktion	39
3.5	Expression von Monocarboxylattransportern auf zytotoxischen T-Lymphozyten und Jurkat-T-Zellen	40
3.6	Proliferation von Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss von CINN und 2-DG	42
3.7	Suppression der Zytokinproduktion durch Milchsäure bei Jurkat-T-Zellen	45
3.8	IL-2-Bestimmung bei Jurkat-T-Zellen im Zellkulturüberstand mit ELISA	46
3.9	Proliferation von Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss von IL-2	47

4 Diskussion **48**

4.1	Effekte der Milchsäure auf die T-Zelle	49
4.1.1	Einfluss von Milchsäure auf das Proliferationsverhalten von CD8 ⁺ T-Lymphozyten, Jurkat-T-Zellen und CD4 ⁺ T-Lymphozyten	49
4.1.2	Einfluss von Milchsäure auf das Apoptoseverhalten von CD8 ⁺ T-Lymphozyten und Jurkat-T-Zellen	50
4.1.3	Einfluss von Milchsäure auf die Zytokinproduktion von Jurkat-T-Zellen	50

4.2	Mechanismus des Milchsäureeffektes	51
5	Zusammenfassung	53
<hr/>		
6	Literaturverzeichnis	56
<hr/>		
7	Danksagung	64
<hr/>		
8	Lebenslauf	65
<hr/>		

1. Einleitung

Das Immunsystem des Menschen entwickelte sich, um potentielle Gefahren vom Organismus abzuwehren. Die zwei wesentlichen Aufgaben dieses Systems bestehen darin, ein Individuum gegen „Angriffe“ von außen (Bakterien, Viren, Parasiten) und von „innen“ (entartete Zellen) zu schützen. Bewältigt werden können diese Aufgaben durch die unterschiedlichen Komponenten des Immunsystems: angeborenes und erworbenes Immunsystem. Das angeborene Immunsystem sorgt dabei mit Makrophagen, Komplementsystem und Natürlichen Killerzellen für eine schnelle, aber relativ unspezifische Abwehr. T- und B-Lymphozyten hingegen ermöglichen in Form des erworbenen Immunsystems eine spezifische Abwehr und Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses, das im Falle einer erneuten Infektion für eine schnelle, effektive Abwehr sorgt. Dadurch erklärt sich die tragende Rolle dieser Zellen bei der Bekämpfung von schädigenden, körperfremden Agentien wie auch körpereigenen Tumoren. Die komplexen Vorgänge dieses Systems können durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden.

1.1 Immunsystem – der Ursprung der T-Zellen

Alle zellulären Bestandteile des Blutes stammen letztendlich von einer hämatopoetischen Vorläuferzelle ab. Man bezeichnet sie auch als pluripotent, da sich aus ihr sowohl rote Blutkörperchen, Blutplättchen als auch die weißen Blutzellen entwickeln. Dabei entwickeln sich aus der sich selbst erneuernden Zelle zunächst Vorläuferzellen mit eingeschränktem Potential, die sogenannten myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen.

Die myeloiden Vorläuferzellen sind die Vorstufe der Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen. Diese Zellen repräsentieren vor allem die angeborene Immunabwehr. Aus lymphatischen Vorläuferzellen gehen unter dem Einfluss von Interleukinen B- und T-Lymphozyten hervor, die die beiden Hauptgruppen der Lymphozyten bilden, und natürliche Killerzellen. Die Vorläuferzellen der B-Lymphozyten verbleiben bis zur völligen Ausdifferenzierung im Knochenmark, während die Vorstufen der T-Lymphozyten für ihre Ausreifung in den Thymus wandern, der zusammen mit dem Knochenmark die primären lymphatischen Organe bildet. In der äußeren Rinde des Thymus teilen sich die Prä-T-Lymphozyten wiederholt und lernen durch Interaktion mit Epithelzellen zwischen fremden und eigenen Proteinen zu unterscheiden. Durch diese Differenzierung werden verschiedene, zellcharakterisierende Marker auf der Zelloberfläche induziert (z. B. TCR, CD3, CD4, CD8).

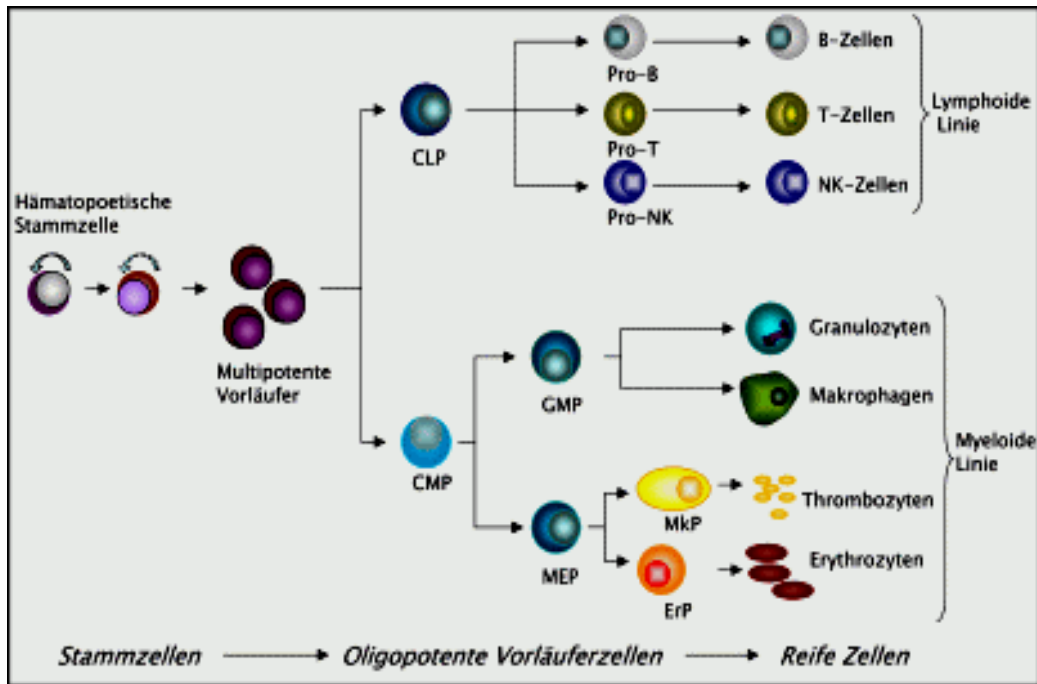


Abb. 1: Hämatopoese (Quelle: Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, www.hpi-hamburg.de).

In Abhängigkeit von diesen exprimierten Rezeptoren entsteht die funktionell uneinheitliche Zellgruppe der T-Lymphozyten. Man unterscheidet drei große Subtypen, die sich wesentlich durch ihre Funktion charakterisieren lassen: T-Helferzellen ($CD4^+$), regulatorische T-Zellen ($CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$) und zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$). Die gereiften T-Lymphozyten verlassen den Thymus und gelangen mit dem Blut in die peripheren lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Tonsillen, Milz oder Lymphfollikel des Darmes, die darauf spezialisiert sind, Antigene abzufangen und eine adaptive Immunantwort einzuleiten.

1.2 Rolle der T-Zellen bei Infektionen und Tumorabwehr

Nachdem die Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus abgeschlossen ist, gelangen die Zellen ins Blut und werden dann im Kreislauf zu den peripheren lymphatischen Organen weiter transportiert. Die T-Zellen pendeln dabei solange zwischen Blut und peripherem Lymphgewebe hin und her, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Reife T-Lymphozyten, die bei ihrer Wanderung noch nicht auf ihr Antigen gestoßen sind nennt man naive T-Zellen. Allerdings sind diese nicht fähig Effektorfunktionen durchzuführen, die zur Beseitigung des Krankheitserregers führen.

Allgemein erkennen T-Zellen über den T-Zellrezeptor (TCR) und Korezeptoren (CD4, CD8, CD28) die entsprechenden Fremdanigene infizierter bzw. entarteter Zellen. Der TCR erkennt

dabei nur Antigenfragmente, die von Zellen auf sogenannten MHC-Molekülen präsentiert werden. Charakteristisch ist, dass alle Zellen eines Organismus regelmäßig ihre Peptide auf MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentieren. MHC-II-Moleküle tragen hingegen nur die Antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie dendritische Zellen (DC), B-Lymphozyten oder Makrophagen. Dabei führt die Interaktion von MHC-I-Molekülen zur Aktivierung von CD8-positiven T-Lymphozyten, wohingegen CD4-positive T-Zellen nur über Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen aktiviert werden können.

Die erworbene Immunantwort wird durch unterschiedliche T-Lymphozyten reguliert: CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen.

Bei den CD4-positiven T-Zellen unterscheidet man vier Subtypen: T-Helferzellen Typ 1 (T_H1), T-Helferzellen Typ 2 (T_H2), regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und T-Helferzellen Typ 17 (T_H17). Der T_H1-Subtyp spielt eine essentielle Rolle in der Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen. T_H1-Effektorzellen, die Antigene auf MHC II-Molekülen erkennen, aktivieren Makrophagen durch Interaktion von CD40-Liganden und CD40, sowie durch die Freisetzung von makrophagenstimulierendem Interferon- γ (IFN- γ). Durch lysosomale Enzyme der Makrophagen kann nun der Erreger eliminiert werden. T_H1-Effektorzellen stellen somit einen wichtigen Bestandteil der zellulären Immunantwort dar. Der T_H2-Subtyp hingegen ist für die Initiation der B-Zellantwort von Bedeutung. Aktivierte T_H2-Zellen exprimieren ebenfalls CD40-Ligand, der an CD40 auf B-Zellen bindet und über die Sezernierung von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), sowie Interleukin-10 (IL-10) die humorale Immunantwort durch die B-Zellen anregt. Außerdem werden durch IL-4, IL-5 und IL-10 aktivierte Makrophagen gehemmt und können so eine Schädigung des umliegenden Gewebes durch eine überschießende T_H1-Reaktion verhindern. Die regulatorischen T-Zellen (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺) besitzen die Fähigkeit, autoimmune Prozesse eines Organismus zu unterdrücken. Hingegen sind die T-Helferzellen Typ 17 (T_H17) durch ein Zusammenspiel von TGF- β und IL-6 für das Auftreten und die Aufrechterhaltung autoimmuner Erkrankungen eines Organismus verantwortlich (Steinman, 2007).

Die zweite Hauptgruppe der T-Lymphozyten stellen die CD8-positiven T-Zellen dar. Diese sogenannten zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) mit dem für sie typischen Korezeptor CD8 treten dabei mit Zellen in Wechselwirkung, die ihre Antigenpeptide auf MHC-I-Molekülen präsentieren. Die CTL binden nach Antigenerkennung über Integrine fest an ihre Zielzelle, perforieren mit Hilfe von Perforinen die Membran der infizierten Zelle und induzieren über Granzyme die Apoptose der Zielzelle. Diese Immunzellen stellen über die Erkennung von

Tumorantigenen, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden einen wichtigen Abwehrmechanismus des Immunsystems gegen Neoplasien dar.

Neben Effektorzellen, die nach der Beseitigung der Infektion durch Apoptose absterben, differenzieren Lymphozyten auch zu Gedächtniszellen aus, die sehr langlebig sind und auch nach Abklingen der Infektion und Abwesenheit des Erregers überleben und sich im Falle einer Sekundärinfektion sehr rasch in Effektorzellen umwandeln können. Dies erklärt die hohe Effektivität und schnelle Reaktionsmöglichkeit des erworbenen Immunsystems.

1.3 „Immun Escape“-Mechanismen von Tumoren

Die Elimination von Tumoren gehört zur physiologischen Funktion des Immunsystems. Die typische Effektorfunktion von CD8-positiven T-Zellen ist es, bei Erkennung des spezifischen Antigens auf Zielzellen im Kontakt mit MHC-I-Molekülen mittels Perforinen und Granzymen die Apoptose der Zielzelle zu induzieren. Da jede kernhaltige Zelle eines Organismus MHC-I-Moleküle exprimiert, kann potentiell auch jede Tumorzelle zerstört werden.

Trotz dieses Abwehrmechanismus haben Tumoren Möglichkeiten entwickelt dem Immunsystem zu entgehen. Dies bezeichnet man als „Immune Escape“. Dabei werden u. a. die folgenden Mechanismen diskutiert:

1. Es gibt Tumoren, die nicht immunogen sind, da sie keine Expression von MHC-I-Moleküle aufweisen und sie dadurch von T-Zellen nicht erkannt werden (Demanet et al., 2004).
2. Adhäsionsmoleküle (z. B. LFA-1, LFA-3) oder kostimulatorische Moleküle (z. B. CD80, CD86, CD40) können fehlen, die für eine Adhäsion der Lymphozyten bzw. deren Aktivierung benötigt werden (Overwijk et al., 2005).
3. Tumorzellen sind allgemein genetisch instabil und können auch dadurch dem Immunsystem entkommen, dass sie immunogene Antigene nicht exprimieren (Maraveyas et al., 1998).
4. Tumorzellen können immunsuppressive Zytokine produzieren. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen vermehrt das immunsuppressiv wirkende Zytokin IL-10 exprimieren (Maraveyas et al., 1998). Außerdem stören

Wachstumsfaktoren wie Transforming-growth-factor (TGF- β) oder Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), die von Tumorzellen gebildet werden, die adäquate Antigenpräsentation von APC bzw. erleichtern die Anbindung des Tumors an die Blutversorgung (Shurin et al., 2006).

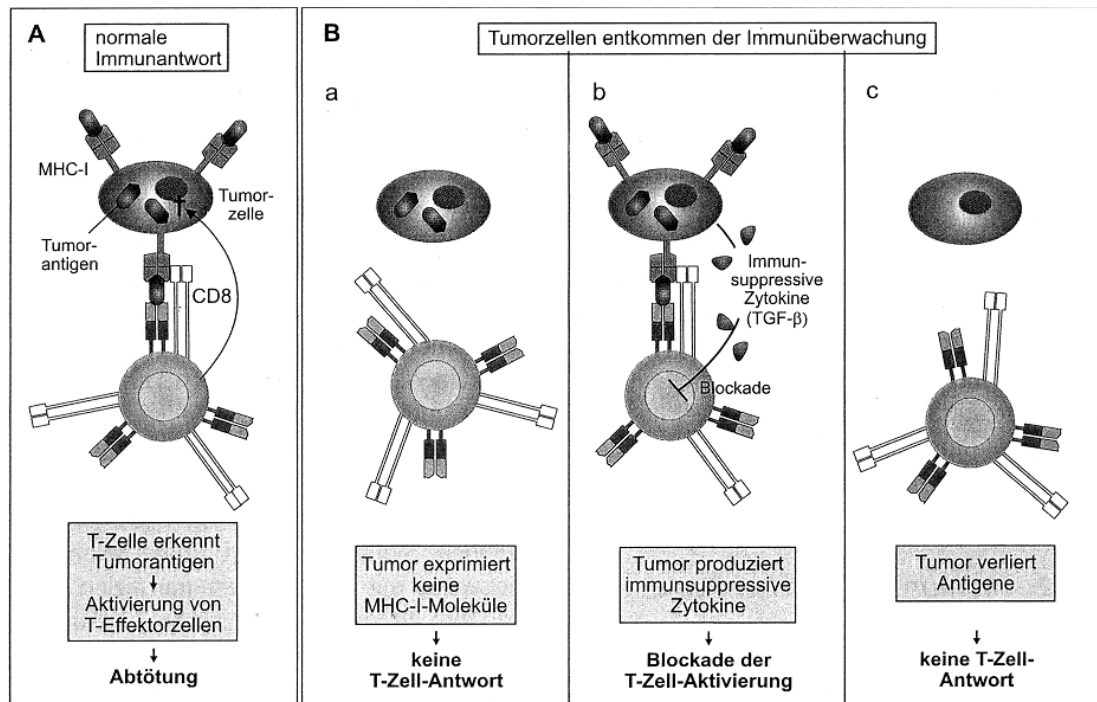


Abb. 2: Mechanismus des „Immun Escape“ von Tumoren (nach Vollmar/ Dingermann; Immunologie, Deutscher Apothekerverlag, 2005):

A Tumorzellen können eine normale Immunantwort auslösen, wenn sie Antigene besitzen, die als ausreichend fremd erkannt werden.

B Tumorzellen können dieser Überwachung durch das Immunsystem entkommen, indem sie beispielsweise

- keine MHC-Moleküle exprimieren,
- immunsuppressive Zytokine produzieren oder
- ihre Antigene verlieren.

1.4 Tumormetabolismus und Immunmodulation

Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass der spezifische Metabolismus der Tumorzelle bzw. seine Metabolite einen starken Einfluss auf Immunzellen ausübt und diese in einen anergen Zustand versetzt. Bekannt ist z. B. ein verstärkter Verbrauch von Aminosäuren vor allem von Arginin und Tryptophan durch Tumorzellen. Dies kann unter anderem auch zur Suppression von zytotoxischen T-Zellen führen. Im Gegensatz zu Normalzellen ist Arginin für Tumorzellen eine essentielle Aminosäure und ihr Entzug induziert Apoptose. Zudem zeigen Tumorzellen zum Teil eine hohe Expression von Arginin-metabolisierenden Enzymen wie NO-Syntha-

se (NOS) und Arginase. Diese Enzyme wurden in verschiedenen Tumoren beschrieben und eine Blockade der NOS/Arginase der Tumorzellen führte in einem Mausmodell des Prostatakarzinoms zu einer verstärkten T-Zellaktivität (Bronte et al., 2005). Eine Arbeit von Uyttenhove et al. (2003) konnte zeigen, dass die meisten humanen Tumoren Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) exprimieren, ein Enzym, das sonst vor allem in der Plazenta exprimiert wird. Es ist für den Tryptophanabbau notwendig. Dabei entzieht die verstärkte Aufnahme von Tryptophan in Tumorzellen einerseits den T-Zellen die notwendige Aminosäure, andererseits inhibieren Tryptophan-Metabolite direkt die T-Zellaktivität. Dies verhindert die Akkumulation spezifischer T-Zellen im Tumor und führte im Mausmodell zu einer verstärkten Tumorrogression (Uyttenhove et al., 2003).

In anderen Tumoren wie beispielsweise Kolonkarzinom, malignes Melanom, Brust- oder Bronchialkarzinom, konnte eine Überexpression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) festgestellt werden (Gately et al., 2004). Dieses Enzym ist für die Bildung von Metaboliten der Arachidonsäure wie Prostaglandine und Thromboxane verantwortlich. Vor allem Prostaglandin E₂ führt in Tumorzellen zu einer Hochregulation von IDO, welche wiederum die T-Zellaktivierung inhibiert (Munn et al., 2002).

Ganglioside sind Lipide, die von Tumoren wie Neuroblastom, Retinoblastom, malignem Melanom, Hepatozellulärem Karzinom, Kolonkarzinom oder Lymphom gebildet und aus der Tumorzelle geschleust werden. Ganglioside gehören zur Familie der Glycosphingolipide mit einem N-Acetylneuraminsäurerest und stellen einen wesentlichen Membranbaustein der Zelle dar (Lauc et al., 2006). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Ganglioside die Immunantwort gegen Tumore unterdrückt (Sietsma et al., 1998; Ladisch et al., 1987; Biswas et al., 2006) und dass bei Hypoxie abnorme Ganglioside in Tumorzellen exprimiert werden (Yin et al., 2006). Es ist ihnen z. B. möglich, die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu hemmen (Sietsma et al., 1998). Und es konnte gezeigt werden, dass antigenpräsentierende dendritische Zellen, die zusammen mit Gangliosiden inkubiert wurden, in der Expression von kostimulatorischen Molekülen gestört waren und dadurch keine normale T-Zellaktivierung mehr möglich war (Caldwell et al., 2003).

1.5 Ursachen des veränderten Glukosemetabolismus in Tumorzellen

Weitere Veränderungen der Tumorzelle im Gegensatz zum Metabolismus der Normalzelle finden sich im Glukosestoffwechsel. Bei der Energiegewinnung der meisten Normalzellen eines Organismus wird Glucose durch einen aeroben Abbau vollständig zu CO₂ und H₂O

abgebaut (Zellatmung). Dabei wird im sogenannten Zitratzyklus (Tricarbonsäurezyklus) mit anschließender oxidativer Phosphorylierung die maximale Energieausbeute für die Zelle erreicht. Steht der Zelle jedoch kein oder nur wenig Sauerstoff (Hypoxie) zur Verfügung, ist es möglich die Energiegewinnung durch eine Umstellung auf Glykolyse aufrecht zu erhalten. Die Hypoxie führt im Gewebe zu einer Stabilisierung von HIF (Hypoxia inducible factor). HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der wichtige Gene des Zellmetabolismus reguliert, z.B. LDH-5 (Koukourakis et al., 2005) und VEGF (Dai et al., 2007). Durch die Stabilisierung von HIF kommt es zur Akkumulation dieses Transkriptionsfaktors im hypoxischen Milieu. Dies führt über die Induktion von LDH und anderen glykolytischen Enzymen zu einer hohen Glykolyserate und über die Induktion von VEGF zur verstärkten Angiogenese.

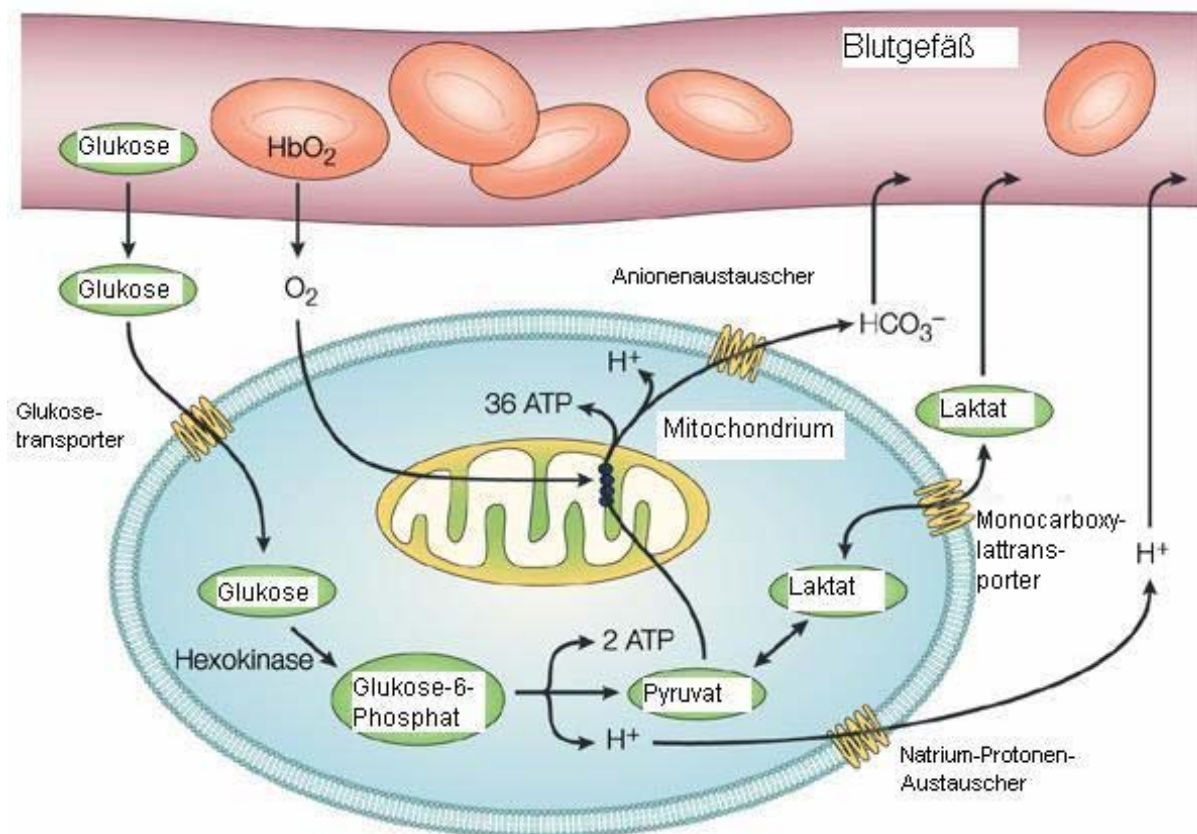


Abb. 3: Glukosemetabolismus in Säugetierzellen. Afferente Blutgefäße transportieren Glukose und Sauerstoff (O_2) ins Gewebe, wo sie über Diffusion die Zelle erreichen. Glukose wird über spezifische Transporter in die Zelle aufgenommen und zuerst zu Glukose-6-Phosphat konvertiert (v. a. mit Hilfe des Enzymes Hexokinase) und anschließend zu Pyruvat, wobei pro Glukosemolekül 2 ATP entstehen. In der Gegenwart von Sauerstoff, wird Pyruvat in den Mitochondrien der Zelle unter Gewinnung von 36 zusätzlichen ATP-Molekülen zu CO_2 und H_2O und anschließend zu HCO_3^- abgebaut. Ohne Sauerstoff wird Pyruvat zu Laktat reduziert, das aus der Zelle transportiert wird. Beide Vorgänge produzieren Protonen (H^+), die zur Ansäuerung des Extrazellularraumes führen; MCT, Monocarboxylattransporter (verändert nach Gatenby und Gillies, 2004).

Bereits in den 20er Jahren konnte Otto Warburg zeigen, dass es Tumorzellen auch möglich ist in Gegenwart von Sauerstoff die sogenannte „aerobe Glykolyse“ als Möglichkeit der Energiegewinnung zu nutzen („Warburg Effekt“). Hingegen wird bei den meisten Normalzellen die Glykolyse in Gegenwart von Sauerstoff inhibiert („Pasteur-Effekt“). Heute kennt man einige genetische Grundlagen für den "Warburg Effekt". Durch Transformation der Tumorzelle kommt es unabhängig von HIF zur Hochregulation von Laktatdehydrogenase (LDH) über c-myc (Shim et al., 1997).

Das Enzym LDH katalysiert die reversible Reaktion von Pyruvat zu Laktat. Es sind derzeit fünf verschiedene LDH-Isoenzyme bekannt (LDH-1 bis 5). Dabei handelt es sich um Tetramere, die aus Proteinen zweier verschiedener Gene (LDH-A, LDH-B) zusammengesetzt sind. Im Normalgewebe findet man vor allem LDH-1 (4 x LDH-B), die anfallendes Laktat in Pyruvat umwandelt. Die LDH-5 (4 x LDH-A) arbeitet am effizientesten in hypoxischem Milieu. Sie wandelt Pyruvat in Laktat um und ist daher vor allem in Tumorzellen erhöht nachweisbar (Koukourakis et al., 2003).

Durch den enorm gesteigerten Glukoseverbrauch der Zellen, kommt es zur Anhäufung des glykolytischen Abbauproduktes Laktat im Tumormilieu. Hieraus resultiert eine kontinuierliche Ansäuerung des Tumormilieus durch die Akkumulation von Laktatanionen und H^+ -Ionen im Extrazellularraum und der extrazelluläre pH sinkt ab auf Werte von 5,6 – 6,6, wobei der intrazelluläre pH im normalen Bereich von 6,9 – 7,4 gehalten wird (Wahl et al., 2002).

Walenta et al. (2004) konnten zeigen, dass in Biopsien verschiedener solider Tumoren (z. B. Kolorektales Karzinom, Karzinome im Kopf-Hals-Bereich) hohe lokale Laktatkonzentrationen nachzuweisen waren und diese mit der Metastasierungshäufigkeit korrelierten, wohingegen niedrigere Laktatkonzentrationen mit einem längeren und krankheitsfreiem Gesamtüberleben assoziiert waren.

1.6 Diagnostik: Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET)

Diagnostisch macht man sich bereits seit Jahren die Tatsache des gesteigerten Glukoseverbrauchs verschiedener Tumore in Form der 18-Fluoro-Deoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) zunutze. Diese stellt ein nicht-invasives, dreidimensional bildgebendes Diagnostikum vor allem in onkologischen Bereichen der klinischen Medizin dar. Und es konnte gezeigt werden, dass die FDG-PET eine weitaus sensitivere und spezifischere Methode im Staging von malignen Lymphomen darstellt, als beispielsweise eine Computertomographie oder eine $^{67}\text{Gallium}$ -Szintigraphie (Seam et al., 2007). Nach der Injektion von 18-

FDG, einem radioaktivmarkiertem Glukosemolekül, wird dieses analog der Glukose in die Zelle transportiert und dort phosphoryliert. Da das entstandene FDG-6-Phosphat nicht wie physiologisches Glukose-6-Phosphat weiter abgebaut werden kann, erfolgt eine Akkumulation in der Zelle. Man kann nach etwa 60 Minuten das Positronen-emittierende Isotop ^{18}F detektieren und den Ort im Organismus mit einer erhöhten Emission diagnostisch interpretieren.

1.7 Glukosemetabolismus und Immunmodulation

Von dendritischen Zellen (DC), die von großer Bedeutung für die Aktivierung von T-Lymphozyten sind, ist bereits bekannt, dass die von Tumorzellen gebildete Milchsäure diese Zellen beeinflusst. Niedriger Sauerstoffgehalt und ein abgesenkter pH-Wert alleine haben jedoch nach den Ergebnissen von Gottfried et al. (2005) lediglich geringen Effekt auf die Differenzierung von Monozyten zu immunologisch aktiven dendritischen Zellen.

Es ist bekannt, dass auch T-Lymphozyten während ihrer Aktivierung einen Teil ihrer Energie, ähnlich den Tumorzellen, aus anaerober Glykolyse beziehen (Frauwirth und Thompson, 2004). Und eine Arbeit von Cham et al. (2008) beschreibt die Hemmung von CD8-positiven T-Lymphozyten durch einen Entzug von Glukose. Für T-Lymphozyten wurde andererseits gezeigt, dass ein niedriger extrazellulärer pH-Wert Apoptose bei zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren kann (Li und Eastman (1995).

1.8 Zielsetzung

Das Tumormilieu beeinflusst in vielfältiger Weise die Aktivierung und Differenzierung infiltrierender Immunzellen. Dies ist von entscheidender Bedeutung in Hinblick darauf, ob eine effektive Immunantwort möglich wird und somit der Tumor eliminiert werden kann.

Neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird das Tumormilieu auch von der Anwesenheit bestimmter Stoffwechselprodukte geprägt. Hierzu gehört u. a. Milchsäure, ein Metabolit des Glukosestoffwechsels. Obwohl seit vielen Jahren bekannt ist, dass Tumoren verstärkt aerobe Glykolyse durchführen, gibt es wenige Arbeiten zum Einfluss von Milchsäure auf Immunzellen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Milchsäure auf zytotoxische T-Zellen (CTL) zu untersuchen, da diese Zellen zentrale Effektorzellen einer Immunantwort im Tumor sind.

2. Materialien und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung von Tumorzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Gewinnung von laktathaltigen Tumorüberständen die adhärent wachsenden Tumorzelllinien Mel Im (Melanom), DU 145 (Prostatakarzinom) und PC 3 (Prostatakarzinom) (alle von ATCC) verwendet. Diese wurden in mittleren Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium kultiviert, bestehend aus 500ml RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen:

- 2ml Vitamine (100x) (Gibco, Karlsruhe)
- 5ml L-Glutamin (200mM; Gibco, Karlsruhe)
- 5ml MEM (non-essential Amino Acids) (Gibco, Karlsruhe)
- 5ml Natriumpyruvat (100mM) (Gibco, Karlsruhe)
- 2ml PenStrep (40 IU/ml Penicillin/ 40µg/ml Streptomycin) (Gibco, Karlsruhe) und
- 50ml FCS (fetales Kälberserum; PAA, Pasching, Österreich).

Die Zellsplittung der adhärent wachsenden Tumorzellen erfolgte nach mikroskopischer Wachstumskontrolle etwa alle drei bis vier Tage. Die Zellen wurden dabei nach einmaligem Waschen mit 10ml PBS (Gibco, Karlsruhe) durch Zugabe von 1ml Trypsin/ EDTA (PAN Biotech, Aidenbach) über fünf Minuten bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Nach dem anschließenden Abzentrifugieren wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt, um schließlich in 20ml frisches Medium eingesät zu werden (1 x 10⁶ Zellen/ 20ml Medium).

Eine weitere verwendete Tumorzelllinie waren Jurkat-T-Zellen (von DSMZ). Diese sind im Gegensatz zu den vorher genannten Zellen in Suspension wachsende Zellen einer humanen akuten lymphatischen T-Zell Leukämie, die bereits im Jahre 1976 von peripherem Blut gewonnen wurde (CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, CD6⁺, CD7⁺, CD8⁻, CD13⁻, CD19⁻, CD34⁺, TCRαβ⁺, TCRγδ⁻). Die Splittung erfolgte nach Beurteilung des verwendeten Mediums, das sich mit abnehmendem pH-Wert von rosa zu gelb verfärbte. Das verwendete Jurkat-T-Zell-Medium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 500ml RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe)
- 2ml Vitamine (100x) (Gibco, Karlsruhe)
- 5ml L-Glutamin (200mM; Gibco, Karlsruhe)
- 5ml MEM (non-essential Amino Acids) (Gibco, Karlsruhe)

5ml Natriumpyruvat (100mM) (Gibco, Karlsruhe)
 2ml PenStrep (40 IU/ml Penicillin/ 40µg/ml Streptomycin) (Gibco, Karlsruhe)
 0,5ml Mercaptoethanol (5×10^{-5} M) (Gibco, Karlsruhe) und
 50ml FCS (fetales Kälberserum; PAA, Pasching, Österreich).

2.1.2 Gewinnung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten und reifen dendritischen Zellen

Antigen-spezifische T-Zellen wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Professor Mackensen präpariert und zur Verfügung gestellt.

Zur Gewinnung von antigen-spezifischen CTL wurden magnetisch aufgereinigte (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) „naive“ CD8⁺ T-Zellen von gesunden Spendern mit reifen dendritischen Zellen (mDC) in 96-Lochplatten in FCS-freiem Medium inkubiert, das mit 10% humanem AB-Serum (PAN Biotech, Aidenbach) und 3% T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) versetzt wurde (A⁺TF1x-Medium). 3%iges TCGF enthält 10-20 IU IL-2 /ml.

Für die Herstellung von TCGF wurden PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mit Phytohemmagglutinin (PHA; Sigma), Phorbo-Myristat-Acetat (PMA; Sigma) und bestrahlten EBV-transformierten B-Zellen für zwei Stunden stimuliert und anschließend gewaschen. Nach weiteren 40 Stunden Inkubation der Zellen (37°C, 6% CO₂) wurden die Überstände geerntet und bei -20°C gelagert.

Reife DCs wurden durch Inkubation von elutrierten Monozyten (FicollHypaque und Dichtezentrifugation mit der J6M-E-Zentrifuge, Beckmann, München) in RPMI-1640 Medium zusammen mit 10% FCS, 250 U/ml GM-CSF (Leukine/Sargramostim, Immunex), 250 U/ml IL-4 (Promocell, Heidelberg) und 5 ng/ml TGF-β1 (PeproTech Inc., USA) gewonnen. Dabei wurden an den Tagen 5 bis 7 TNF (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml), IL-1β (10 ng/ml) und Prostaglandin-E₂ (1 µg/ml) zugegeben, um die Zellen zur Reifung zu bringen.

Die gereiften DCs (2×10^6) wurden vor der Inkubation mit den T-Zellen für 2 Stunden mit MelanA-Peptid (30µg/ml; Clinalfa, Laeufelfingen, Schweiz) und humanem β2-Microglobulin (10 µg/ml; Scipac, Kent, UK) gepulst. Die CD8-positiven T-Zellen wurden einmal wöchentlich mit diesen restimuliert.

Nachdem die CD8⁺ T-Zellen drei Stimulationzyklen von je vier Tagen durchlaufen hatten, zeigte eine MHC-Multimer-Analyse (Beckman/ Coulter, Fullerton, CA) eine Anreicherung von Melan-A-spezifischen T-Zellen (ca. 80 –90%).

2.2 Funktionelle Analysen

2.2.1 Zytotoxische T-Lymphozyten

2.2.1.1 Proliferationsbestimmung mit [³H]-Thymidin

Um den Effekt von Milchsäure auf die Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) zu untersuchen, wurden stimulierte CTL in je vier Reihen einer 96-well Platte pipettiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium so aufgenommen, dass 78.000 in einem Volumen von 225µl pro well waren.

Das verwendete Medium entspricht:

- 500ml RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe)
- 2ml Vitamine (100x) (Gibco, Karlsruhe)
- 5ml L-Glutamin (200mM; Gibco, Karlsruhe)
- 5ml MEM (non-essential Amino Acids) (Gibco, Karlsruhe)
- 5ml Natriumpyruvat (100mM) (Gibco, Karlsruhe)
- 2ml PenStrep (40 IU/ml Penicillin/ 40µg/ml Streptomycin) (Gibco, Karlsruhe)
- 0,5ml Mercaptoethanol (5×10^{-5} M) (Gibco, Karlsruhe)
- 50ml AB-Serum (PAN Biotech, Aidenbach) und
- 3% TCGF.

Zur Herstellung der benötigten Milchsäureverdünnungen wurde aus einer 2M Stocklösung (Sigma, Taufkirchen) zunächst eine 100mM und 200mM Lösung hergestellt. Davon wurden jeweils 25µl in die entsprechenden Wells pipettiert, wobei sich entsprechend 10mM bzw. 20mM Milchsäure als Endkonzentration pro well ergaben. In die Vergleichsreihe kamen 25µl Medium ohne Milchsäure. Um einen spezifischen Effekt der Milchsäure von der bloßen Wirkung der „ansäuernden“ H^+ -Ionen auf die Zellen unterscheiden zu können, wurde in einer weiteren Reihe durch Zugabe von je 10µl HCL 1% (Sigma, Taufkirchen) ein pH-Wert von etwa 6,5 eingestellt, der dem der 20mM Milchsäure entsprach.

Möglichst zeitgleich zur Milch- bzw. Salzsäurezugabe wurden 10µl/well (37.000 Bq/well) des Proliferationsmarkers Methyl-[³H]-Thymidin (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) in einer Konzentration von 3,7 MBq/ml zugegeben. Die Inkorporation von [³H]-Thymidin stellt eine Methode zur Bestimmung der Zellproliferation dar (Ngyuyen et al., 2003). Hierbei wird Thymidin in die DNS proliferierender Zellen eingebaut. Das Wachstum und somit der [³H]-Thymidineinbau in die Zelle wurde nach 6,5hrs bzw. nach 24hrs durch Einfrieren der Platten bei -20°C gestoppt. Die Zellen wurden geerntet (Wallac Harvester; PerkinElmer,

Gaithersburg, MD) und die [^3H]-Inkorporationsrate mit Hilfe eines Beta-Counters (PerkinElmer, Gaithersburg, MD) in cpm („counts per minute“) bestimmt.

Neben Hemmung der Proliferation stellte sich auch die Frage nach möglicher Reversibilität dieser Wachstumshemmung, die bei CTL unter dem Einfluss von Milchsäure hervorgerufen wurde. Eine 96-well Titerplatte wurde hierfür mit drei Reihen à 78.000 Zellen pro well befüllt. Analog zu dem Beschriebenen, je eine Reihe ohne Milchsäurezugabe, eine Reihe mit 10mM MS und eine Reihe mit 20mM MS. Die Platte wurde für 1,5hrs im Brutschrank (37 °C, 6% CO_2) inkubiert. Danach wurde vorsichtig der Überstand abgesaugt. Damit Zellverluste minimiert wurden, zentrifugierte man die Titerplatte zuvor bei 1200rpm für 4 Minuten ab. Anschließend wurden die verbliebenen Zellpellets dreimal mit je 125 μl A TF1x -Medium gewaschen und frisches Medium zugegeben. Zur Detektion wurde pro well 10 μl Methyl- ^3H -Thymidin zupipettiert. Nach 24 Stunden Einbauzeit wurde das Zellwachstum durch Einfrieren bei -20°C gestoppt und nach dem Auftauen die in die Zellen eingebaute Radioaktivität mit Hilfe des Beta-Counters gemessen. Die Radioaktivität stellte so ein Maß für die stattgefundene Zellproliferation dar. Als Vergleichsprobe diente eine Platte, bei der kein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

2.2.1.2 Apoptosebestimmung mit Durchflusszytometrie

Damit festgestellt werden konnte, ob die eingesetzten Zellen während der Behandlung mit Milchsäure in Apoptose gingen und starben oder lediglich die Zellteilung durch eine Herunterregulation bzw. Änderung des Zellstoffwechsels supprimiert wurde, wurde eine Antikörperfärbung mit Annexin-V-FITC (BD/ Pharmingen, Heidelberg) und Propidiumjodid (PI; Calbiochem, Darmstadt) verwendet. Die Detektion der markierten Zellen ermöglicht die Durchflusszytometrie. Das Ziel der Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS) besteht in der Charakterisierung von Zellen entsprechend der Expression bestimmter Oberflächenproteine. Diese werden durch Antikörper, die direkt mit Markerproteinen (z. B. Fluoreszeinisothiozyanat, FITC; Phycoerythrin, PE) konjugiert sind, dargestellt. Pro Versuchsansatz wurden erneut 96-well Platten wie oben vorbereitet, jedoch ohne den Zusatz von Methyl- ^3H -Thymidin. Die Zellplatten wurden für 6,5 bzw. 24 Stunden bei 37 °C und 6% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach abgelaufener Zeitspanne wurden zwischen 100.000 und 200.000 Zellen aus den wells in je ein FACS-Röhrchen geerntet und mit je 1ml PBS gewaschen und anschließend abzentrifugiert (1500rpm, 6 Minuten). Der Überstand wurde verworfen. In jedes Röhrchen wurden jetzt 150 μl Annexin-Puffer (1x) (BD/ Pharmingen, Heidelberg) und 5 μl Annexin-V-FITC (BD/ Pharmingen, Heidelberg) pipettiert und für 15

Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Erst unmittelbar vor der Messung wurde pro Röhrchen 1,5µl PI zugegeben. Es erfolgte die Intensitätsmessung des emittierten Lichtes als Maß für die Antigenexpression der Zellen, die mit einem FACS-Calibur (BD, Immunocytometry Systems, San José, USA) bestimmt wurde.

Im Prinzip wurde dabei die Zellsuspension durch ein Kapillarröhrchen geführt, in dem die optische Strahlung von 20.000 markierten Einzelzellen gemessen wurde. Dabei konvertieren Photodetektoren die optischen Signale in elektrische Impulse. Die Ergebnisse wurden schließlich als Fluoreszenzintensität wiedergegeben. Zur Charakterisierung des detektierten Zelltyps dient bei dieser Methode außerdem die Granularität und die Größe einer Zelle. Diese Parameter werden aufgrund der Lichtstreuung erkannt und im „side scatter“ bzw. „forward scatter“ wiedergegeben.

Gehen Zellen in Apoptose, verändern sich ihre Zellmembranen dahingehend, dass in der äußeren Lipidschicht der Doppelmembranstruktur verstärkt Phosphatidylserin exprimiert ist. Annexin-V hat die Eigenschaft, spezifisch an Phosphatidylserin zu binden. PI bindet hingegen an DNA-Bruchstücke, die sich nur im Zellinneren befinden und eine Färbung mit PI setzt daher bereits eine defekte Membranstruktur voraus. Allerdings wird es auch bei längerer Inkubation in die Zellen aufgenommen, was zu einem Messfehler führen kann.

2.2.2 Jurkat-T-Zellen

2.2.2.1 Proliferationsbestimmung mit [³H]-Thymidin

Um zu zeigen, ob sich entartete Zellen anders verhalten bezüglich Proliferation, Reversibilität oder Apoptose, wurden die oben mit CTL beschriebenen Versuchsabläufe mit Jurkat-T-Zellen (CD4⁺) wiederholt. Da diese Zellen jedoch um ein Vielfaches größer sind und stärker proliferieren als CTL, wurde die Zellzahl von 78.000 auf 39.000 Zellen pro well reduziert.

Zusätzlich wurde der Effekt von Zimtsäure (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CINN; Sigma, Taufkirchen) und 2-Deoxyglucose (2-DG; Sigma, Taufkirchen) auf Jurkat-T-Zellen untersucht. Es wurden die folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Milchsäure:	10; 20; 40 mM,
Zimtsäure:	3; 9 mM,
2-Deoxyglucose:	10 und 100 mM.

Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 10µl [Methyl-³H]-Thymidin (3,7 MBq/ml) pro well. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank (37 °C, 6% CO₂) inkubiert, danach eingefroren bei -20 °C und im Anschluss die eingebaute Radioaktivität mit dem Beta-Counter detektiert.

Analog zu den CTL wurde mit minimierter Zellzahl (39.000 Zellen pro well) die Reversibilität der Wachstumshemmung bei Jurkat-T-Zellen nach 1,5 Stunden untersucht.

2.2.2.2 Apoptosebestimmung mit Durchflusszytometrie

Die Untersuchung der Apoptosebereitschaft von Jurkat-T-Zellen wurde wie bei den CTL beschrieben durchgeführt. Verändert waren die Zellzahl (39.000 Zellen pro well) und es wurde zusätzlich 40mM Milchsäure eingesetzt.

2.2.3 Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Monocarboxylattransportern auf T-Zellen

2.2.3.1 Jurkat-T-Zellen

Bei der Aktivierung von T-Zellen kommt es zur vermehrten Glykolyse. Anfallende Produkte wie Laktat oder Pyruvat werden mit Hilfe sogenannter Monocarboxylattransporter (MCT) konzentrationsabhängig zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus aus der Zelle transportiert. Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Milchsäure die Expression der MCTs auf T-Zellen positiv beeinflusst, erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Transportmoleküle auf Jurkat-T-Zellen und CTL.

Eine Markierung der Monocarboxylattransporter auf der Zelloberfläche erfolgte durch eine indirekte Antikörperfärbung. Dabei bindet zunächst ein Primärantikörper ohne Fluorescein an den MCT. Dieser wird jedoch erst im Durchflusszytometer sichtbar, wenn ein Sekundärantikörper, der gegen den ersten gerichtet ist und seinerseits Fluorescein trägt an diesen Primärantikörper bindet. Für die MCT-Färbung wurden Jurkat-T-Zellen aus der Kulturflasche entnommen ($0,5 \times 10^6$), zweimal mit je 500µl FACS-Puffer (BD/ Pharmingen, Heidelberg) gewaschen und bei 1600rpm für sechs Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen gemäß dem folgenden Protokoll mit indirekten Antikörpern versetzt und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert:

- Isotypkontrolle (Dianova, Hamburg; goat IgG 11,2 µg/µl) 9µl von 1:100 Verdünnung
- MCT-1 (Abcam, Cambridge, UK; polykl.goat AK IgG 0,5 µg/µl) 2µl
- MCT-2 (Abcam, Cambridge, UK; polykl.goat AK IgG 0,5 µg/µl) 2µl
- MCT-3 (Santa Cruz, Californien, USA; polykl.goat AK IgG 0,2 µg/µl) 5µl
- MCT-4 (Santa Cruz, Californien, USA; polykl.goat AK IgG 0,2 µg/µl) 5µl
- MCT-5 (Abcam, Cambridge, UK; polykl.goat AK IgG 0,5 µg/µl) 2µl
- Isotypkontrolle (Dianova, Hamburg; rabbit IgG 11,2 µg/µl) 5µl von 1:10 Verdünnung
- MCT-6 (Chemion, Leverkusen; polykl.rabbit AK 0,5 µg/µl) 10µl

MCT-7 (Chemion, Leverkusen; polykl.rabbit AK 0,5 µg/µl) 10µl

Anschließend erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers:

MCT-1 – 5: rabbit anti goat-FITC (Dianova, Hamburg) 1µl/Röhrchen.

MCT-6, -7: goat anti rabbit-PE (Dianova, Hamburg) 2µl/Röhrchen.

Die Zellpellets kamen erneut für 30 Minuten bei 4°C in den Kühlschrank, wurden anschließend zweimal mit je 500µl FACS-Waschpuffer gewaschen und mit je 500µl PFA 1% (1g Paraformaldehyd in 100ml PBS) fixiert und durchflusszytometrisch detektiert.

Die restlichen Zellen wurden mit folgenden direkt-markierten Antikörpern ebenfalls für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert:

Isotypkontrolle (B/D Pharmingen, Heidelberg; mouse-anti-human IgG1-PE 11,2 µg/µl) 5µl von 1:100 Verdünnung

CD 45-PE (Caltag, Californien, USA; mouse-anti-human IgG1 0,5 µg/µl) 5µl

CD 147-PE (Serotec, Kidlington, UK; mouse-anti-human IgG1 0,5 µg/µl) 2µl

HLA-ABC-PE (BD/ Pharmingen, Heidelberg; mouse-anti-human IgG1 0,5 µg/µl) 5µl.

Nach abgelaufener Zeit wurden alle Zellpellets zweimal mit je 500µl FACS-Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert (1600rpm; 6 Minuten). Auch die Röhrchen mit direkter AK-Färbung konnten nun mit 500µl PFA 1% fixiert werden, um sie maximal eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C aufzubewahren bevor sie mit der Durchflusszytometrie vermessen wurden.

2.2.3.2 Zytotoxische T-Lymphozyten

Der oben beschriebene Nachweis von MCT wurde für CTL nur für den in der Literatur am häufigsten angeführten Transporter MCT-1 durchgeführt. Dazu wurden etwa $0,5 \times 10^6$ Zellen antigenspezifischer T-Zellen aus 96-Lochplatten entnommen und in gleicher Weise wie die Jurkat-T-Zellen in den Versuch eingesetzt, gefärbt und durchflusszytometrisch vermessen.

2.2.4 Bestimmung von Monocarboxylattransportern auf T-Zellen mittels Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine geeignete Trägermembran übertragen werden ("Blotting").

Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert werden. Die Bindung der Makromoleküle erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Protein-Moleküle

bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels erhält. Da die Proteine nach dem Transfer für die Behandlung mit verschiedenen Liganden, Antikörpern oder Enzymsubstraten zugänglich sind, erlaubt der Einsatz der Blotting-Technik nicht nur auf einfache Weise qualitative und quantitative Bestimmungen einzelner Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine, sondern auch deren Identifikation.

Für unsere Analysen wurden entweder frisch isolierte CD8-positive Zellen oder CTL verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe der Elektrophoresetechnik in 15 %igem SDS-Gel (Natriumdodecylsulfat, Sodium Dodecyl Sulfate) aufgetrennt und anschließend mittels senkrecht zum Gel gerichtetem elektrischem Feld auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen (Millipore, Bedford, MA). Nach dem Blocken mit Trockenmilch (5 %) in Tris-Puffer (TBST) wurden die Membranen mit monoklonalen Antikörpern (α -MCT-1, α -MCT-2 (1:1.000; Abcam, Cambridge, UK) oder α - β -Actin (1:2.000; Sigma) inkubiert. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit Sekundärantikörper. Für die Entwicklung der Blots wurden ECL-Reagenzien verwendet (Amersham, Freiburg).

2.2.5 Proliferationsbestimmung mittels CFSE-Färbung bei Jurkat-T-Zellen

Die Färbung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl (CFSE) stellt wie der Einbau von Methyl- ^3H -Thymidin eine Möglichkeit dar, das Wachstum der Zellen zu beurteilen. Allerdings hat diese Methode den Vorteil nicht auf radioaktive Stoffe angewiesen zu sein.

Die in Suspension vorliegenden Jurkat-T-Zellen wurden aus der Kulturflasche in ein 50ml-Falcon geerntet, gezählt und zweimal mit je 15ml PBS gewaschen und zentrifugiert (1300rpm, 7 Minuten). Anschließend wurden 10 Millionen Zellen/ml PBS aufgenommen und von dieser Lösung 1ml in ein neues 15ml-Falcon überführt. Die Zellen wurden nun erneut abzentrifugiert (1200rpm; 10 Minuten). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 500 μ l PBS und 500 μ l Färbelösung bestehend aus 5ml PBS und 4 μ l CFSE (5mM; Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt und unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Da CFSE lichtempfindlich ist und wurde ab dem Zugabezeitpunkt der Färbelösung bei reduzierter Beleuchtung gearbeitet. Nach vier Minuten Inkubationszeit wurde der Einbauvorgang des CFSE in die Zellmembran durch die Zugabe von 12ml PBS/ 10% FCS gestoppt. Die überschüssige Lösung wurde abzentrifugiert (1200rpm; 10 Minuten) und verworfen. Die markierten Zellen wurden in 12ml Medium aufgenommen, gezählt und in den Versuch eingesetzt. Dazu wurden in eine Mikrotiterplatte mit 96-well vier Reihen Zellen ausplattiert (39.000/well à 180 μ l Medium).

Um das Proliferationsverhalten der Zellen unter dem Einfluss verschiedener Milchsäurekonzentrationen im Milieu vergleichen zu können, wurden Milchsäureverdünnungen mit der Endkonzentration 10mM und 20mM hergestellt. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine 20mM Na⁺-Laktatlösung eingesetzt. Es wurden pro well jeweils 20µl der entsprechenden Lösung (Milchsäure, Na⁺-Laktat) zugegeben. Gemessen wurde die Abnahme der emittierten Lichtintensität bei sich teilenden Zellen mit der Durchflusszytometrie am Tag 1 und 3 nach der CFSE-Färbung. Hierfür wurden 5 FACS-Röhrchen vermessen:

Ungefärbte Zellen aus der Kulturflasche

Gefärbte Zellen ohne MS

Gefärbte Zellen mit 10mM MS

Gefärbte Zellen mit 20mM MS und

Gefärbte Zellen mit 20mM Na⁺-Laktat

Die Jurkat-T-Zellen wurden mit je 1ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (1500rpm; 5 Minuten) bevor sie unmittelbar vor der FACS-Messung mit 1,5µl PI pro Röhrchen versetzt wurden, um den Anteil toter Zellen bestimmen zu können.

2.2.6 Gemischte Lymphozytenreaktion

Im Organismus werden T-Zellen mit Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen (APC) z. B. dendritischen Zellen über MHC-I/II-Moleküle aktiviert und zur Proliferation angeregt. Um sich der physiologischen Situation anzunähern, wurde eine gemischte Lymphozytenreaktion durchgeführt. Dabei wurden reife dendritische Zellen (mDCs) eines Spenders und naive T-Lymphozyten eines anderen Spenders zusammengebracht. Es erfolgte eine T-Zellaktivierung durch die Präsentation von körperfremden Antigenen durch die APC.

Die Zellen wurden in folgendem Medium inkubiert:

500 ml RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe)

2ml Vitamine (100x) (Gibco, Karlsruhe)

5ml L-Glutamin (200mM; Gibco, Karlsruhe)

5ml MEM (non-essential Amino Acids) (Gibco, Karlsruhe)

5ml Natriumpyruvat (100mM) (Gibco, Karlsruhe)

2ml PenStrep (40 IU/ml Penicillin/ 40µg/ml Streptomycin) (Gibco, Karlsruhe)

50ml FCS (PAA, Pasching, Österreich) und

10ml AB-Serum (PAN Biotech, Aidenbach).

Es wurden reife dendritische Zellen (mDC) (Gewinnung siehe 2.1.2) als Stimulatorzellen in die wells von 96-well Mikrotiterplatten in den Konzentrationen 2.500 und 10.000 Zellen pro

well mit allogenen T-Lymphozyten als Responderzellen in konstanter Konzentration von 100.000 Zellen pro well unter sterilen Bedingungen kokultiviert. Damit die Zellen optimal in Kontakt treten konnten, wurde anschließend die Platte 8 Minuten bei 300g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen über fünf Tage bei 37°C und 6% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Dabei hatten die Stimulatorzellen Gelegenheit, die Responderzellen zur Proliferation anzuregen. Als Kontrollen dienten die isoliert angesetzten allogenen T-Zellen ohne APC. Um den Einfluss eines Tumormilieus auf die Proliferation von T-Lymphozyten zu simulieren, wurde Milchsäure (10mM und 20mM) für 24 Stunden zu den DCs und T-Lymphozyten gegeben. Bei der MLR wurde die Proliferationsrate orientierend im Mikroskop untersucht, wobei Cluster von interagierenden Zellen erkennbar waren, deren Dichtigkeit von der Proliferationsaktivität der Responderzellen abhing. Zur quantitativen Messung der T-Zellproliferation wurden am Tag 5 die Zellen mit je 10µl Methyl-[³H]-Thymidin pro well versetzt, das nur von den proliferierenden T-Lymphozyten aufgenommen wurde. Nach 24 Stunden erfolgte die Zellernnte mit Hilfe des Wallac Harvester, wonach die Inkorporationsrate von [³H]-Thymidin im Beta-Counter bestimmt wurde.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion

In der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann DNA bzw. RNA nach reverser Transkription nachgewiesen werden. Dabei wird ein durch zwei Primer festgelegter DNA-Abschnitt in einer bestimmten Anzahl von Reproduktionszyklen vervielfältigt, so dass eine Aussage über das Vorhandensein einer bestimmten mRNA getroffen werden kann. Im Rahmen der Arbeit wurde Interleukin-2- und Interferon-gamma-mRNA-Expression durch die Jurkat-T-Zellen untersucht. Zunächst wurden dafür die Jurkat-T-Zellen in frisches Medium aufgenommen und steril in eine 24-well Mikrotiterplatte pipettiert (je 1 x 10⁶ Zellen in 1ml Medium). Die Zellen eines Ansatzes wurden nach Zugabe von Milchsäure mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA; Sigma) und Ionomycin (Sigma) stimuliert und die Zellen eines zweiten Ansatzes blieben als Kontrolle unstimuliert. Für die Ansätze wurde Milchsäure aus der 2M Stocklösung direkt in die wells pipettiert, um die Konzentrationen 10mM (5µl 2M-Stocklösung), 20mM (10µl 2M-Stocklösung) und 40mM (20µl 2M-Stocklsg.) zu erhalten. Anschließend wurden die Platten wieder für 2,5 Stunden inkubiert (37 °C; 6% CO₂). Jetzt wurden die Zellen aus den wells in verschiedene 50ml-Falcons geerntet, zentrifugierte die Überstände ab (1600rpm; 7 Minuten). Die verbliebenen Zellpellets wurden gemäß dem RNeasy Kit (Promega, Madison, USA) lysiert, die RNA laut Promega-Protokoll aufgereinigt und mit dem BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg) vermessen. Mittels Reverser Transkriptase wurde cDNA gewonnen.

Diese cDNA-Proben wurden 1:5 vorverdünnt, bevor daraus für die stimulierten bzw. die unstimulierten Proben jeweils drei Standardverdünnungen (1:10; 1:100, 1:200) mit H₂O (USB) hergestellt wurden. Nun wurden 2µl jeder cDNA-Probe für den Light Cycler pipettiert.

- Kapillare 1: H₂O (Kontrolle)
- Kapillare 2: 1:5 Verdünnung stimuliert ohne MS (Standardreihe)
- Kapillare 3: 1:10 Verdünnung stimuliert ohne MS (Standardreihe)
- Kapillare 4: 1:100 Verdünnung stimuliert ohne MS (Standardreihe)
- Kapillare 5: 1:200 Verdünnung stimuliert ohne MS (Standardreihe)
- Kapillare 6: stimuliert 10mM MS
- Kapillare 7: stimuliert. 20mM MS
- Kapillare 8: stimuliert 40mM MS
- Kapillare 9: nicht stimuliert ohne MS
- Kapillare 10: nicht stimuliert 10mM MS
- Kapillare 11: nicht stimuliert 20mM MS
- Kapillare 12: nicht stimuliert 40mM MS

Es folgten jeweils 18µl Primer-Master-Mix (Qiagen, Hilden) pro Kapillare bestehend aus:

- QuantiTect SYBR Green PCR MasterMix 10µl (MgCl₂:2,5mM) (Qiagen, Hilden)
- Primer sense (10pmol/µl) 1µl (final: 0,5µM)
- Primer antisense (10pmol/µl) 1µl (final: 0,5µM)
- H₂O (USB) 6µl,

die in die Kapillaren pipettiert wurden. Es wurden 40 PCR-Zyklen im Lightcycler (Roche) gefahren.

Als Primer dienen

- | | |
|--------------|--------------------------------|
| IL-2: sense | 5'-CTCACCAGGATGCTCACATTTA-3' |
| antisense | 5'-TCCAGAGGTTTGAGTTCTTCTTCT-3' |
| IFN-γ: sense | 5'-CTAATTATTCGGTAACTGACTTGA-3' |
| antisense | 5'-ACAGTTCAGCCATCACTTGGA-3' |
| 18s: sense | 5'-ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG-3' |
| antisense | 5'-CCTACGGAAACCTTGTTACGAC-3'. |

Mit jeder Probe wurde zweimal eine PCR durchgeführt und die Werte von IL-2 bzw. IFN- γ jeweils auf den „Housekeeper“ 18s bezogen.

2.2.8 Bestimmung von IL-2 bei Jurkat-T-Zellen mit ELISA

ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) ist ein Verfahren, um einzelne Proteine nachweisen zu können. Dabei nutzt man die Mechanismen des Immunsystems. Wird eine Substanz vom Immunsystem als fremd erkannt, bildet es Antikörper, die an das fremde Molekül andocken und so markieren. Diese Antikörper-Antigen-Reaktion wird für den ELISA-Test genutzt. Proteine werden dabei mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Diese tragen als Konjugat spezifische Enzyme. Durch Zugabe der Enzym-Substrate kann das Protein dann indirekt nachgewiesen werden. Da Zellen in Abhängigkeit ihrer Stoffwechsellage Proteine in ihre Umgebung sezernieren, kann man diese durch ELISA nachweisen.

Es wurden Jurkat-T-Zellen aus ihrer Kulturflasche geerntet, in frisches Medium überführt und in zwei 24-well Platten so verteilt, dass auf jedes well 1×10^6 Zellen in 1ml Medium kamen. Anschließend wurden 10mM bzw. 20mM Milchsäureverdünnungen eingesetzt. Jetzt wurden die Platten für eine Stunde im Brutschrank inkubiert (37 °C, 6% CO₂). Danach wurden alle Zellen einer Platte mit 10 μ l PMA (1:100.000) und 10 μ l Ionomycin (1:1000) jeweils pro well stimuliert und für 24 Stunden inkubiert, bevor die Überstände abgenommen und gefiltert (0,2 μ m) wurden. Es folgte der Proteinnachweis mit Hilfe eines ELISA-Kit (R&D Systems).

2.2.9 Proliferation unter Einfluss von IL-2 bei Jurkat-T-Zellen

Da Interleukin-2 einen Wachstumsfaktor für Lymphozyten darstellt, wurde untersucht, ob die Proliferation von Jurkat-T-Zellen in Gegenwart von Milchsäure beeinflusst wird. Jurkat-T-Zellen wurden dazu aus der Kulturflasche geerntet, gezählt und in zwei Portionen verteilt. Die eine Hälfte wurde in Medium aufgenommen, das mit 100 U/ml IL-2 (PromoCell, Heidelberg) versetzt war und die zweite Hälfte wurde als Negativkontrolle in Medium ohne Zusatz gegeben. Anschließend wurden jeweils drei Reihen der unterschiedlich vorbehandelten Zellen in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert (250 μ l Zellsuspension/well). Es wurden erneut drei Reihen ohne MS, mit 10mM MS und 20 mM MS angesetzt. Gleichzeitig zur Milchsäurezugabe erfolgte die Zugabe von 10 μ l Methyl-[³H]-Thymidin pro well (37.000 Bq/well) und eine anschließende Inkubation bei 37 °C und 6% CO₂ für 24 Stunden. Dann wurden die Platten eingefroren, um den [³H]-Thymidineinbau zu stoppen. Es erfolgte die Messung der [³H]-Thymidin-Inkorporationsrate im Beta-Counter als Maß der Zellproliferation.

2.2.10 Bestimmung des Laktatgehaltes in Zellüberständen

Vom Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums in Regensburg wurde der Laktatgehalt in Zellüberständen von CTL und Jurkat-T-Zellen mit der Hilfe eines ADVIA 1650 (Bayer, Tarrytown, NY) und spezifischen Reagenzien (Roche) bestimmt.

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes („Standard Error of the Mean“, SEM) angegeben. Zur Bestimmung der Unterschiedlichkeit der Werte wurde bei Fallzahlen ≥ 3 eine statistische Analyse unter Einsatz eines gepaarten, zweiseitigen Student T-Test durchgeführt. Hierbei wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationshemmung durch den Einfluss von Milchsäure

3.1.1 [³H]-Thymidininkorporation von zytotoxischen T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) im Tumormilieu scheinen oftmals supprimiert zu sein. Um den Einfluss von Milchsäure auf CTL zu zeigen, wurde zunächst die Fähigkeit zur Proliferation in An- und Abwesenheit von Milchsäure untersucht. In einem Zeitraum von 6,5 Stunden zeigte sich ein signifikant hemmender Effekt der Milchsäure auf die Inkorporation von [³H]-Thymidin, einem Indikator für das Wachstumsverhalten der Zelle. Die Stärke dieses hemmenden Effektes war dabei vom Milchsäuregehalt abhängig. Bei einer Konzentration von 10mM Milchsäure (MS) erfolgte eine signifikante Inhibition von etwa 20 %, 20mM MS schränkten das Wachstum zu ca. 80 % ein, jeweils bezogen auf eine Kontrolle ohne Milchsäure.

Da es unter dem Einfluss von Milchsäure zu einer Ansäuerung des Mediums kommt, untersuchten wir die Inhibition der Proliferation von CTL bei einem mit HCl eingestellten pH-Wert um 6,5, der jenem von 20mM MS entsprach. Es ergab sich eine Hemmung des Zellwachstums von etwa 40 % (Abb. 4). Dies entsprach etwa der Hälfte des Effektes von 20mM Milchsäure.

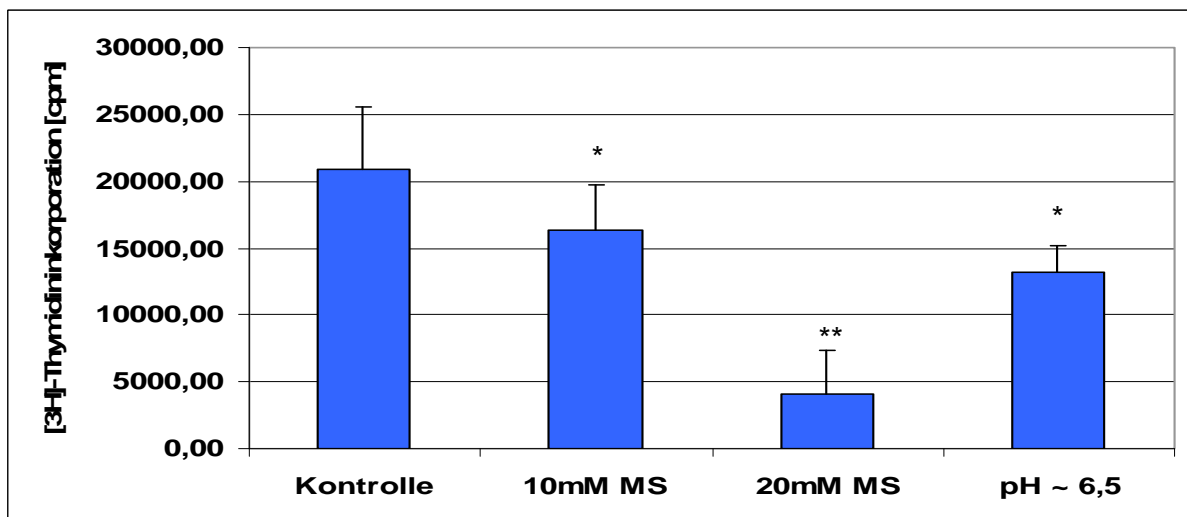


Abb. 4: Hemmung der Proliferation durch MS und HCL. CTL wurden für 6,5 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 10 und 20 mM MS bzw. HCL (pH 6,5) inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [³H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SEM von n = 6 Experimenten. (* p < 0,05; ** p < 0,005).

Für das längere Zeitintervall von 24 Stunden zeigte sich bezüglich der Proliferationshemmung ein zunehmender Effekt des pH. Ein pH-Wert von 6,5 führte zu einer signifikanten Prolifera-

tionshemmung von 60 %. Die Inhibition des Wachstums bei 10mM MS lag bei etwa 25 %, bei 20mM MS bei etwa 60 % (Abb. 5).

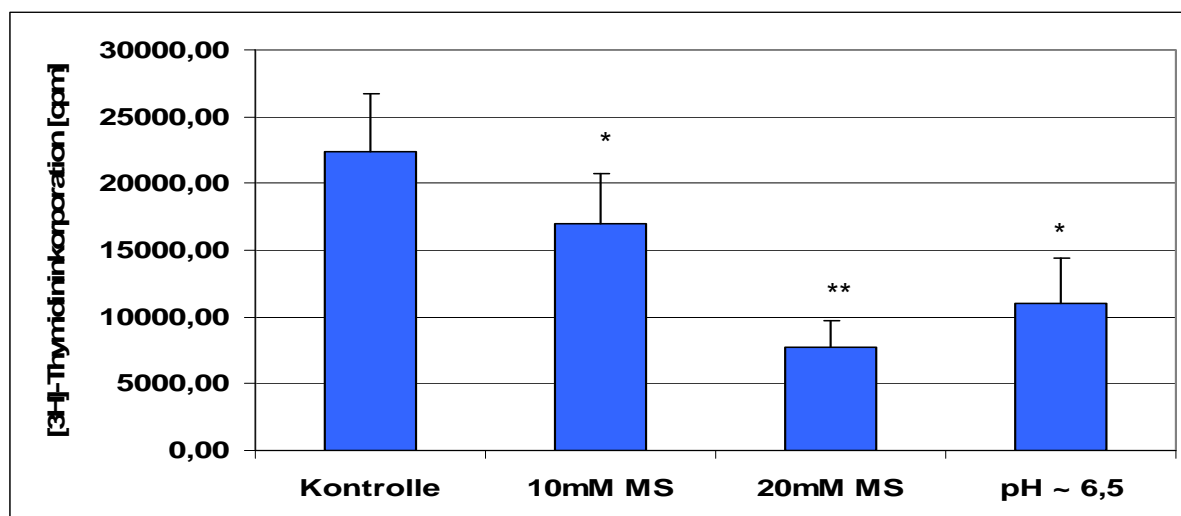


Abb. 5: Hemmung der Proliferation durch MS und HCL. CTL wurden für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 10 und 20 mM MS bzw. HCL (pH 6,5) inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [^3H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Experimenten. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

Anschließend war von Interesse, ob die Proliferationshemmung reversibel ist. Dies ist eine wichtige Überlegung, da für die Bekämpfung eines Tumors kompetente Immunzellen gegebenenfalls auch unter dem Einfluss des Tumormilieus reaktiviert werden können.

Dazu wurden CTL für 1,5 Stunden mit 10mM bzw. 20mM Milchsäure inkubiert und danach bei der Hälfte der behandelten Zellen die Milchsäure durch einen dreimalig durchgeführten Mediumwechsel entfernt.

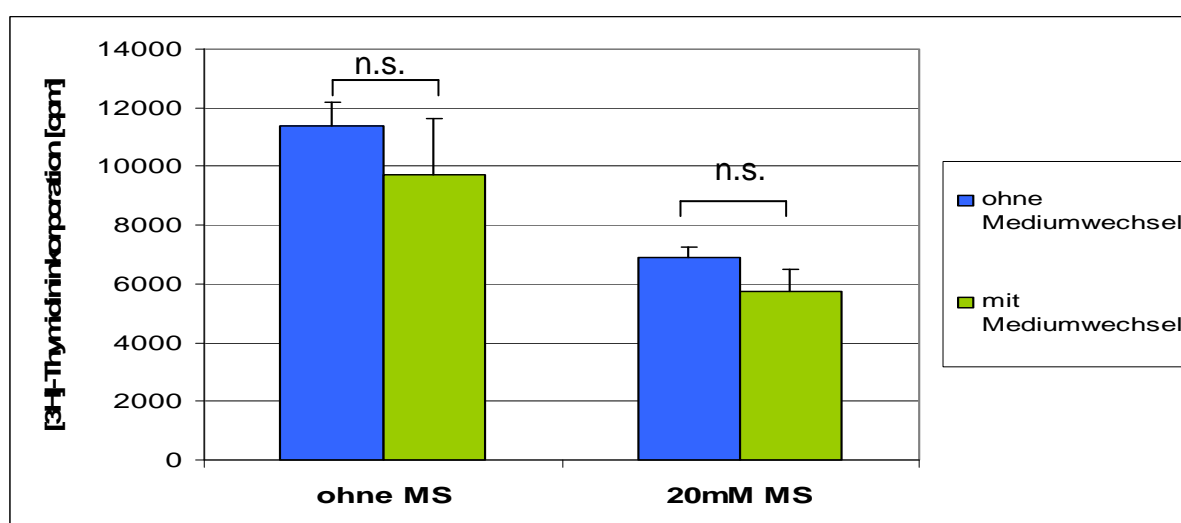


Abb. 6: Untersuchung zur Reversibilität des Milchsäureeffektes bei CTL. CTL wurden über 1,5 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von MS inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel bei der Hälfte der eingesetzten Zellen. Die Proliferation wurde mittels [^3H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ Experimenten (n.s. = nicht signifikant).

In diesem Experiment ergab sich bei den CTL sowohl mit als auch ohne Mediumwechsel eine Hemmung des Wachstums bei 20mM MS. Dies zeigt, dass der Effekt der Milchsäure nicht reversibel ist. In den Kulturen mit Mediumwechsel kam es zu einer leicht verminderten Proliferation, was durch Zellverluste beim Mediumwechsel erklärbar ist. Als Kontrolle diente die Wachstumshemmung der Zellen gemessen ohne Zusatz von Milchsäure (Abb. 6).

3.1.2 [^3H]-Thymidininkorporation von Jurkat-T-Zellen

Um das Verhalten entarteter T-Zellen im Vergleich mit normalen T-Zellen darzustellen, untersuchten wir Jurkat-T-Zellen in den gleichen Versuchsansätzen wie oben beschrieben mit CTL. Bei den Jurkat-T-Zellen handelt es sich um CD4 positive, humane Leukämiezellen einer T-ALL. Auch hier wurde der Effekt der alleinigen Ansäuerung des Kulturmediums mit HCl im Vergleich zu Milchsäure untersucht. Beurteilt wurde die Inkorporationsrate von [^3H]-Thymidin als Zellwachstumsindikator über einen Zeitraum von 24 Stunden. Es ergaben sich für die Proliferationshemmung bei 10mM MS etwa 15 %, bei 20mM MS etwa 60 % und bei 40mM MS knapp 100 %. Bei niedrigem pH (pH ~ 6,5) ergab sich eine Wachstumshemmung von 60 %. Das Proliferationsverhalten der Zellen ohne zugegebene Substanz diente wieder als Kontrolle (Abb. 7).

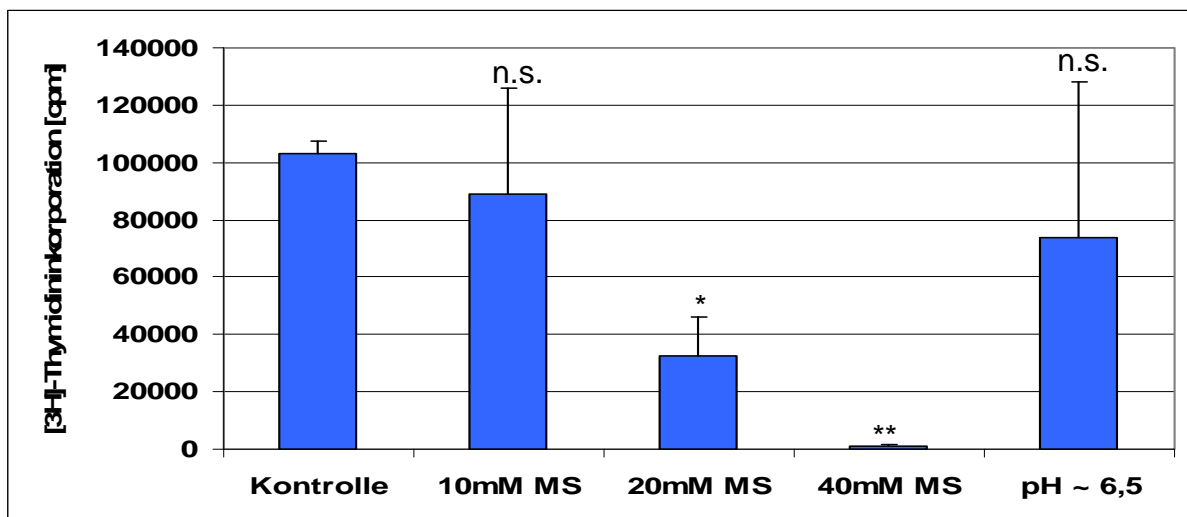


Abb. 7: Hemmung der Proliferation durch MS und HCL. Jurkat wurden für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 10, 20 und 40 mM MS bzw. HCL (pH 6,5) inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [^3H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von n = 3 Experimenten. (* p < 0,05; ** p < 0,005; n.s. = nicht signifikant).

Analog zu den CTL erfolgten Versuche zum Nachweis einer möglichen Reversibilität der Proliferationshemmung bei Jurkat-T-Zellen. Im Experiment mit Mediumwechsel zur Ent-

fernung der Milchsäure, ergaben sich keine Unterschiede in der Inhibition des Zellwachstums (Abb.8). Dies bedeutet, dass der Effekt der Milchsäure nicht reversibel ist.

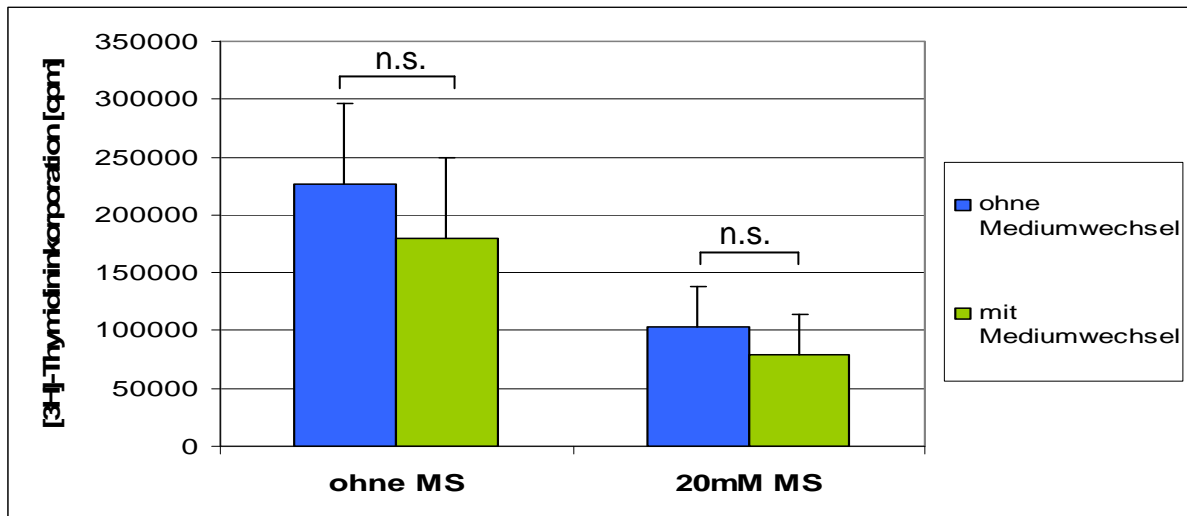
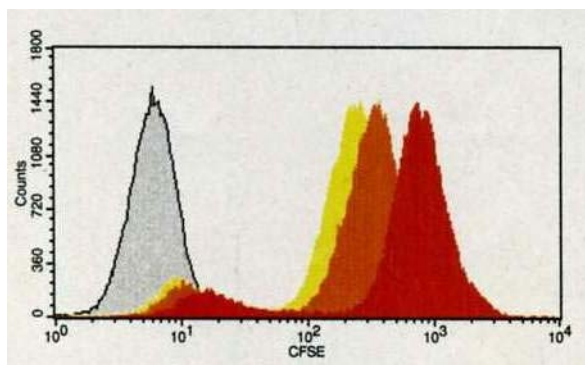


Abb. 8: Untersuchung zur Reversibilität des Milchsäureeffektes bei Jurkat. Jurkat wurden über 1,5 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von MS inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel bei der Hälfte der eingesetzten Zellen. Die Proliferation wurde mittels [^3H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ Experimenten (n.s. = nicht signifikant).

3.2 Proliferationsmessung mittels CFSE-Färbung bei Jurkat-T-Zellen

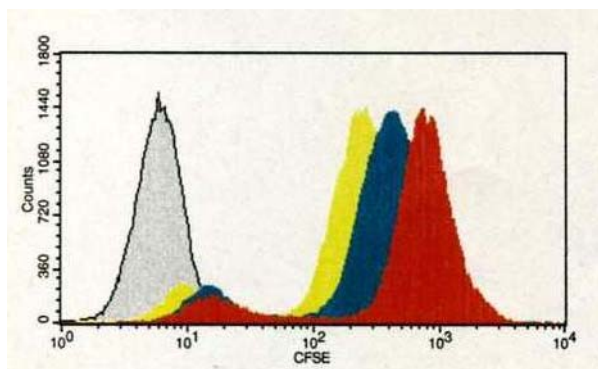
Eine zusätzliche Methode zur Darstellung der Proliferation ist die Zellfärbung mit CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester). Dabei handelt es sich um einen Zellteilungsmarker bestehend aus einem Fluoresceinderivat mit zwei Acetatgruppen und einer Succinimidylestergruppe. Das Molekül ist zellpermeabel und nichtfluoreszierend. Erst durch die Abspaltung der Acetatgruppen mittels zellulärer Esterasen beginnt das Molekül zu fluoreszieren und verliert gleichzeitig die Fähigkeit zur Zellpermeabilität. Die Succinimidylestergruppe bindet an freie Amine im Zytoplasma und es resultiert eine langlebige fluoreszierende Färbung. Bei der Zellteilung wird CFSE im Verhältnis 50:50 auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch ergeben sich mit zunehmender Teilungsrate verschiedene Zellpopulationen mit im Durchflusszytometer. Die Abbildung 9 zeigt, dass mit zunehmender Milchsäurekonzentration die Proliferationsrate der Jurkat-T-Zellen im Laufe der Expositionsdauer von drei Tagen abnahm. Um bei der langen Expositionszeit der Zellen unter Milchsäure auszuschließen, dass tote Zellen detektiert wurden, markierten wir die Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid und es wurden somit nur vitale Zellen ausgewertet.

Zudem erfolgte getrennt hierzu die Zugabe von Natrium-Laktat (20 mM). Dabei handelt es sich um das Natriumsalz der Milchsäure, wobei es bei der gleichen Anzahl an Laktatanionen zu keiner Ansäuerung des Milieus kommt. Im Vergleich zum Einfluss auf die Proliferation unter 20 mM Milchsäure zeigt sich ein abgeschwächter Effekt durch Natrium-Laktat.



Proliferation von Jurkat-T-Zellen nach 3 Tagen Milchsäureexposition:

Grau: Kontrolle ohne CFSE
Gelb: ohne MS
Orange: 10mM MS
Rot: 20mM MS



Proliferation von Jurkat-T-Zellen nach 3 Tagen Milchsäure- bzw. Na⁺-Laktatexposition:

Grau: Kontrolle ohne CFSE
Gelb: ohne MS
Blau: 20mM Na⁺-Laktat
Rot: 20mM MS

Abb. 9: Proliferation von Jurkat-T-Zellen am Tag 3 der Milchsäure- bzw. Na⁺-Laktatexposition mit der CFSE-Färbung. Nach dem „Gaten“ der vitalen Zellen wurden mit Hilfe der PI-Färbung 50.000 vitale Zellen analysiert.

3.3 Apoptoseinduktion durch den Einfluss von Milchsäure

3.3.1 Apoptose bei zytotoxischen T-Lymphozyten

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Milchsäure oder eine Ansäuerung des Kulturmediums die Apoptose bei zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) induziert, wurden CTL mit Annexin-V und Propidiumjodid markiert.

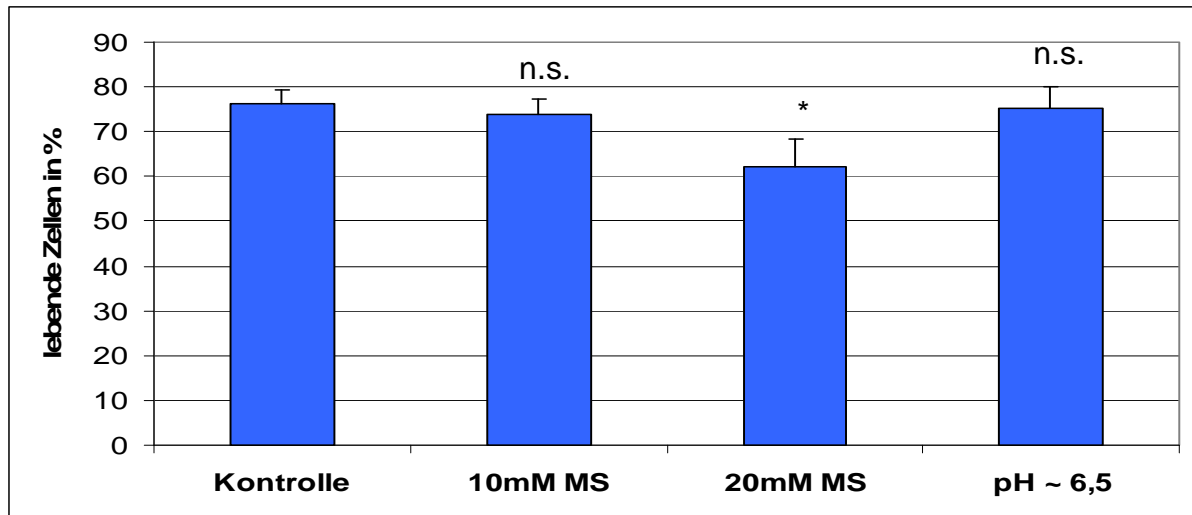


Abb. 10: Apoptoseinduktion bei CTL. CTL wurden mit 10mM, 20mM MS bzw. bei pH 6,5 für 6,5 Stunden inkubiert, danach wurde nach Annexin-V/ PI-Färbung durchflusszytometrisch der Prozentanteil an noch vitalen Zellen analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 9$ (MS) bzw. $n = 4$ (pH) Experimenten (* $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Nach Kurzzeitexposition über 6,5 Stunden ergaben sich für 10mM MS etwa 75 %, für 20mM MS etwa 60 % und für pH ~ 6,5 ca. 75 % lebende Zellen. In der Kontrollgruppe ohne Zugabe von Milchsäure waren nach 6,5 Stunden ebenfalls etwa 75 % der eingesetzten CTL vital (Abb. 10), so dass sich zusammenfassend nur ein signifikanter Effekt unter 20mM Milchsäure auf die Anzahl lebender Zellen zeigte.

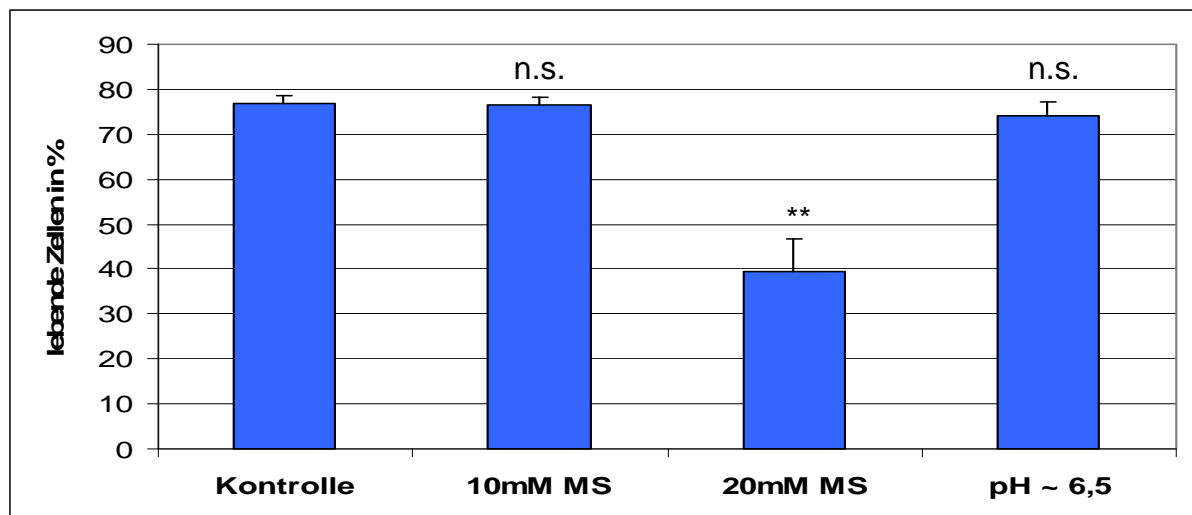


Abb. 11: Apoptoseinduktion bei CTL. CTL wurden mit 10mM, 20mM MS bzw. pH 6,5 für 24 Stunden inkubiert, danach wurde nach Annexin-V/ PI-Färbung durchflusszytometrisch der Prozentanteil an noch vitalen Zellen analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 8$ (MS) bzw. $n = 3$ (pH) Experimenten (** $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant).

Bei längerer Inkubation über 24 Stunden überlebten bei 10mM MS etwa 75 %, bei 20mM MS etwa 40 % und bei pH ~ 6,5 durch HCl etwa 75 % der Zellen, bei einem Wert von ca. 80 % an vitalen CTL in der Kontrollgruppe ohne Zusatz von Substanzen (Abb. 11). Es zeigte sich somit ein deutlich signifikanter Effekt auf die Vitalität der Zellen durch 20mM Milchsäure, der nicht nur auf die Ansäuerung des Kulturmediums zurückzuführen war.

3.3.2 Apoptose bei Jurkat-T-Zellen

Zudem wurde untersucht, ob sich ein Unterschied im Apoptoseverhalten von Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss von Milchsäure bzw. HCl zu CTL zeigt. Mit Hilfe einer Annexin-V/ PI-Färbung ergab sich dabei nach 24 Stunden im analogen Experiment für 10mM MS etwa 70%, bei 20mM MS ca. 50 %, bei 40mM MS nur noch ca. 5 % und bei einem mit HCl erzeugten pH-Wert von 6,5 ca. 65 % an vitalen Zellen (Abb. 12). Jurkat-T-Zellen scheinen somit etwa ähnlich sensibel gegenüber der Wirkung von Milchsäure im Vergleich zu CTL zu sein.

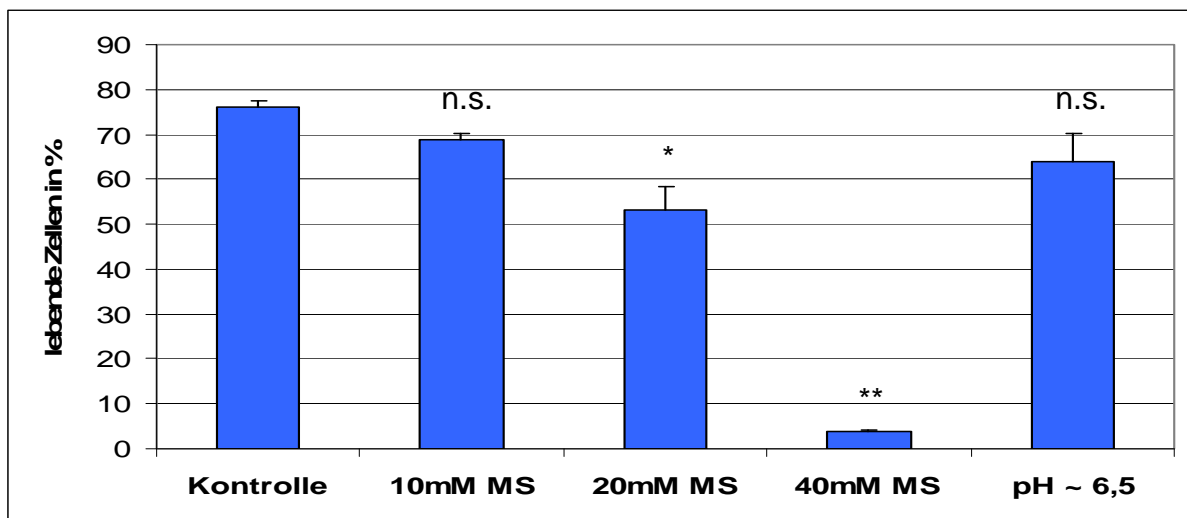


Abb. 12: Apoptoseinduktion bei Jurkat-T-Zellen. Jurkats wurden mit 10mM, 20mM, 40mM MS bzw. pH 6,5 für 24 Stunden inkubiert, danach wurde mit Hilfe von Annexin-V/ PI-Färbung durchflusszytometrisch der Prozentteil an noch vitalen Zellen analysiert. Dargestellte Werte entsprechen dem Mittelwert +/- SEM (ohne MS: n = 11; 10mM MS: n = 8; 20mM MS: n = 11; 40mM MS: p = 3; pH 6,5: n = 4). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant).

3.4 Gemischte Lymphozytenreaktion

Die CD4-T-Zellaktivierung in vivo erfolgt unter anderem durch die Präsentation von körperfremden Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen (APC) auf MHC-II-Molekülen. Die wichtigsten Vertreter der APC sind dendritische Zellen (DC). In der „Gemischten Lymphozytenreaktion“ (MLR; mixed lymphocyte reaction) wurden daher naive T-Lymphozyten mit

reifen dendritischen Zellen (mDCs) inkubiert und im Anschluss die Proliferation in Form der [^3H]-Thymidininkorporationsrate der Zellen bestimmt. Untersucht wurde dabei erneut der Einfluss von Milchsäure (10mM und 20mM). Abbildung 13 stellt die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit vom Effekt der Milchsäure auf die eingesetzten Zellen graphisch dar.

Es zeigte sich eine Zunahme der T-Zellproliferation mit steigender Anzahl an DCs, wobei dendritische Zellen nicht proliferieren. Der gezeigte hemmende Effekt von Milchsäure auf die T-Zellproliferation konnte in der MLR bestätigt werden.

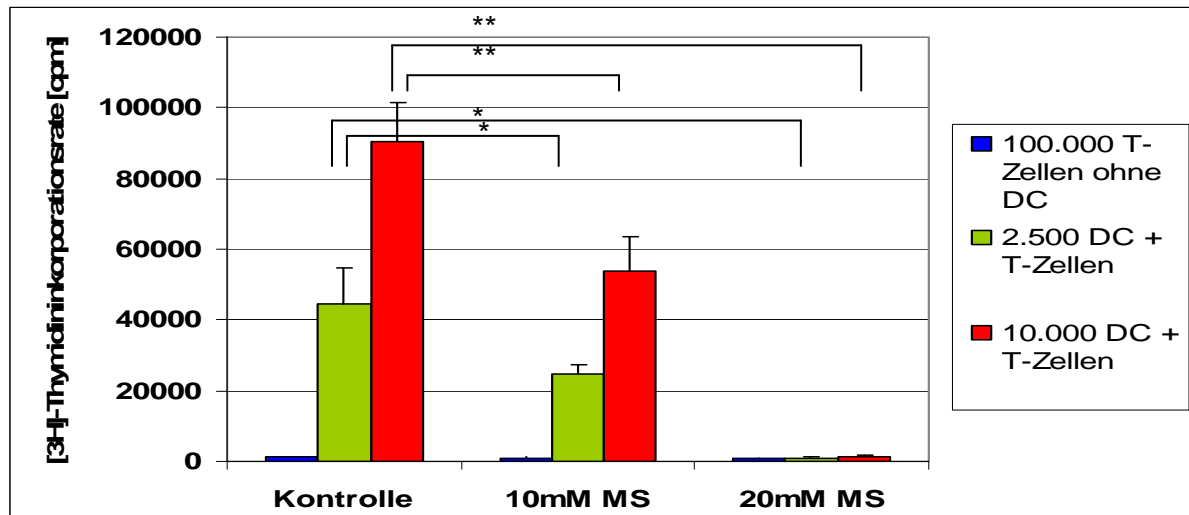


Abb. 13: Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR); [^3H]-Thymidininkorporation (cpm) von 100.000 T-Lymphozyten nach Inkubation mit bzw. ohne DCs (für 5 Tage) unter dem Einfluss von Milchsäure (für 24 Stunden). Mittelwerte \pm SEM (n = 6). (* p < 0,05; ** p < 0,005).

Dies bedeutet, dass neben $\text{CD}8^+$ T-Zellen (CTL) und Jurkat-T-Zellen auch nicht entartete $\text{CD}4^+$ Zellen in ihrer Proliferation supprimiert werden.

3.5 Expression von Monocarboxylattransportern auf zytotoxischen T-Lymphozyten und Jurkat-T-Zellen

Laktat ist nicht nur ein Metabolit von Tumorzellen, sondern wird auch von aktivierten Immunzellen verstärkt produziert. Es ist bekannt, dass bei der Aktivierung von T-Zellen eine Hochregulation der Glykolyse stattfindet, um genügend Energie für die Zelle bereit zu stellen. Dabei kommt es zur Bildung von Laktat in der Zelle. Um einen störungsfreien Ablauf der Glykolyse und somit der Energiegewinnung gewährleisten zu können, muss das anfallende Laktat aus der Zelle transportiert werden, da es sonst den glykolytischen Flux blockiert („Endprodukthemmung“; Murray et al., 2005). Viele Zellen besitzen Monocarboxylattransporter (MCT), welche im Ko-Transport Protonen und Laktat in Abhängigkeit vom Konzentra-

tionsgradienten über die Plasmamembran der Zelle transportieren. Liegt extrazellulär eine hohe Laktatkonzentration vor, so kann intrazelluläres Laktat nicht mehr „abfließen“ und es kommt zum Block der Glykolyse. Dies stellt einen möglichen Wirkmechanismus der Milchsäure dar.

Um den Nachweis von Monocarboxylattransportern auf CTL und Jurkat-T-Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene MCT Färbungen mit polyklonalen Antikörperseren durchgeführt. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden anschließend die Zellen analysiert. CD45 wurde als Positivkontrolle gefärbt sowie CD147 als bekannter Ko-Rezeptor von Monocarboxylattransportern (MCT). Von vier Färbungen mit Jurkat-T-Zellen für MCT 1 – 7 waren in zweien MCT-1 geringfügig nachweisbar. Auch CD45 und CD147 waren deutlich auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 14). Die bei Jurkat-T-Zellen durchgeführten Färbungen von MCT-2 bis MCT-7 ergaben keine nachweisbare Expression auf der Zelloberfläche.

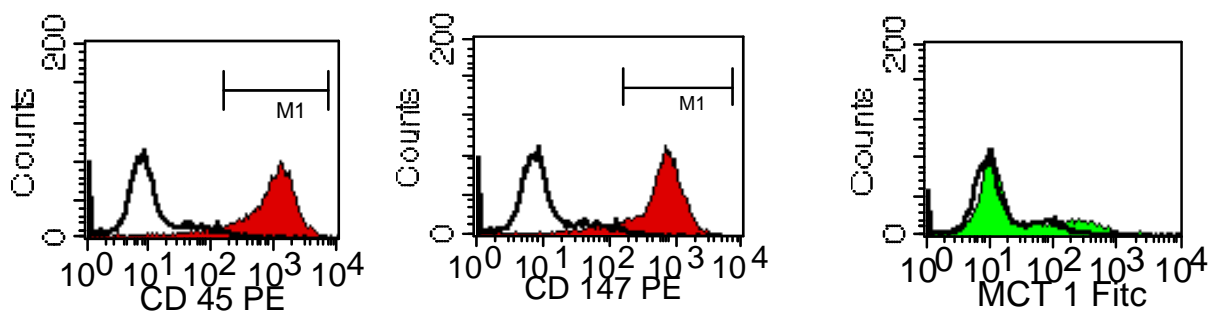


Abb. 14: MCT-1-Expression auf Jurkat-T-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von MCT-1, CD147 und CD45 auf Jurkat-T-Zellen. Die Zellen wurden mit polyklonalen Antiseren in einer indirekten Färbung untersucht.

Da bei Jurkat-T-Zellen nur eine Oberflächenexpression von MCT-1 gezeigt werden konnte, wurde für CTL nur die Färbung für MCT-1 durchgeführt. MCT-1 war dabei nicht nachweisbar, wohingegen CD45 und CD147 deutlich auf den Zellen exprimiert war (Abb. 15 a). Daher wurde ergänzend eine Analyse von MCT-1 mittels Western Blot durchgeführt. Hier konnte deutlich MCT-1 in CTL nachgewiesen werden, nicht aber in frisch isolierten, naiven CD8⁺-T-Lymphozyten (Abb. 15 b).

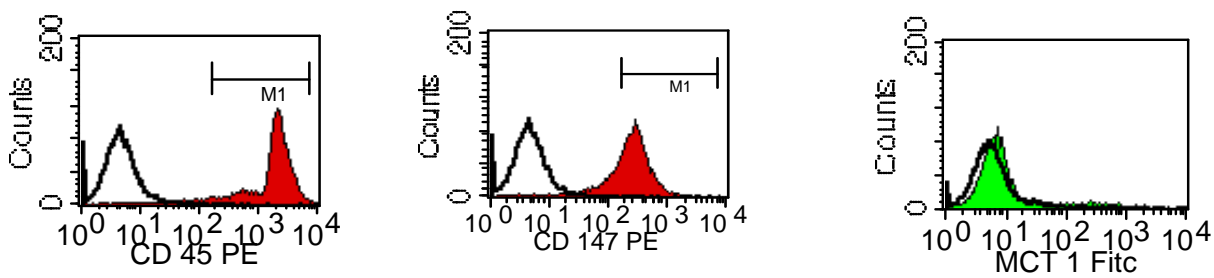


Abb. 15 a: MCT-1-Expression auf CTL. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von MCT-1, CD147 und CD45 auf CTL. Die Zellen wurden mit polyklonalen Antisera in einer indirekten Färbung untersucht.

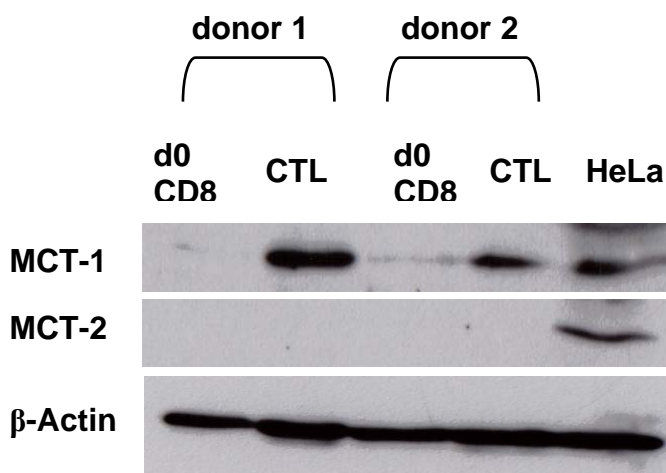


Abb. 15 b: Analyse der Expression von MCT-1 und MCT-2 in CTL und in naiven CD 8-positiven T-Lymphozyten mittels Western Blot. Lysate von frisch isolierten CD8⁺ T-Zellen sowie CTL wurden im Vergleich zu HeLa (Zervixkarzinomzelllinie) analysiert. Eine β -Actinfärbung diente als Beladungskontrolle.

3.6 Proliferation von Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss von CINN und 2-DG

Vor dem Hintergrund, dass T-Zellen MCT-Moleküle exprimieren und die Wirkung der Milchsäure evtl. auf einer Blockade des Laktat-Flux aus der Zelle beruht, war von Interesse, ob die Laktatsekretion bzw. Proliferation der T-Zellen durch Blockade des Monocarboxylat-transporters gehemmt würde.

Bei Laktatmessungen in Zellüberständen von Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss des MCT-Hemmers α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (CINN) ergab sich bei 9 mM CINN eine signifikante Abnahme des Laktats (Abb. 16).

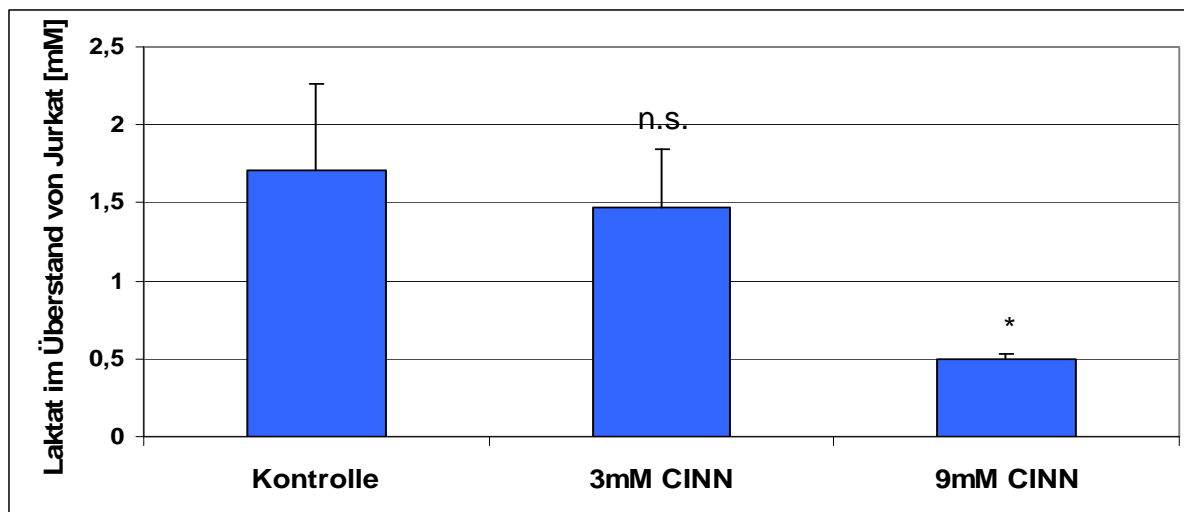


Abb. 16: Laktat in Zellüberständen von Jurkat-T-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (CINN) inkubiert und anschließend wurde in den Zellüberständen Laktat bestimmt. Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM (n = 3). (* p < 0,05; n.s. = nicht signifikant).

Anschließend wurden Jurkat-T-Zellen für 24 Stunden mit Zimtsäure (CINN) inkubiert und dann die [3 H]-Thymidininkorporation detektiert (Abb. 17). Es ergab sich eine Proliferationshemmung von etwa 65 % bei 3mM CINN und von fast 90 % bei 9mM CINN. Dies zeigt, dass MCTs bzw. die Glykolyse und der Abtransport des Laktats wichtig für die Proliferation der T-Zellen sind.

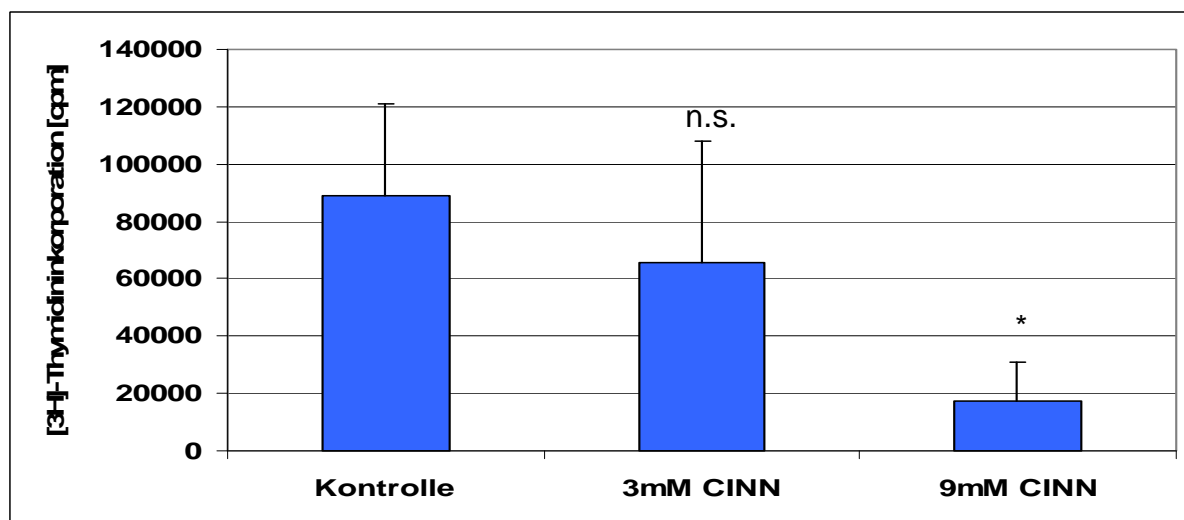


Abb. 17: Hemmung der Proliferation durch CINN. Jurkat-T-Zellen wurden für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 3 mM und 9 mM CINN inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [3 H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von n = 3 Experimenten. (* p < 0,05; n.s. = nicht signifikant).

Zusätzlich zum Effekt der Zimtsäure (CINN) untersuchten wir daher die Wirkung von 2-Deoxyglukose (2-DG), einem Glukoseanalogon auf Jurkat-T-Zellen. Dieses blockiert wichtige Enzyme der Glykolyse (Hexokinase, Phosphoglukoisomerase und Phosphoglukomatase) und stört dadurch die Energiegewinnung der aktivierten T-Zelle über die Glykolyse (Liu et al., 2002; Pelicano et al., 2006). Bei Inkubation mit 100mM 2-DG ergab sich ein signifikantes Absinken des Laktat im Überstand (Abb. 18).

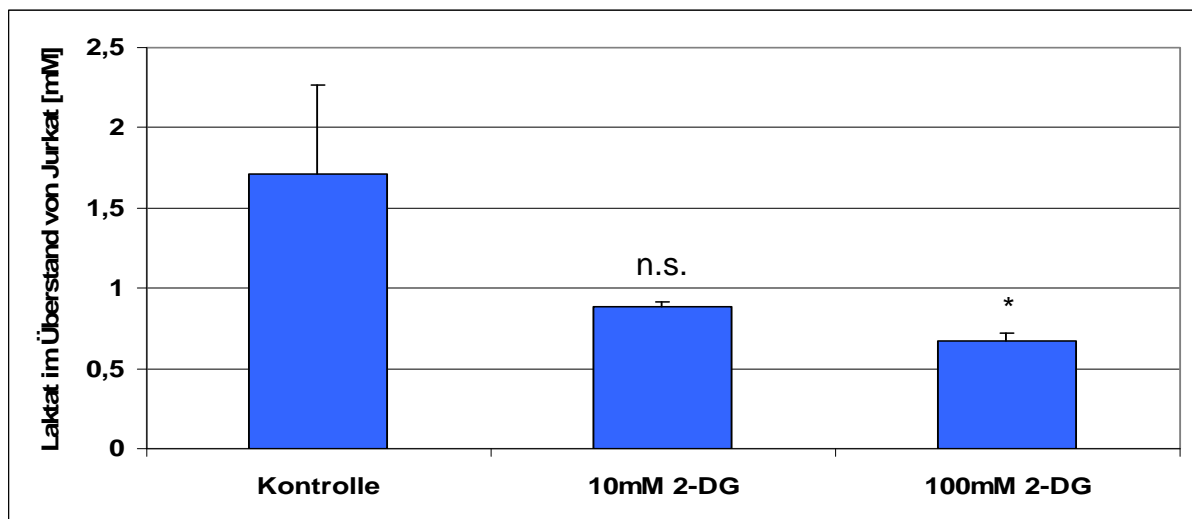


Abb. 18: Laktatbestimmung in Zellüberständen von Jurkat-T-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 2-DG inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n = 3$. (* $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Zudem führte die Zugabe von 2-DG zu einer Wachstumsinhibition, die jedoch nicht statistisch signifikant war (Abb. 19). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die T-Zelle für ihre Proliferation nicht zwangsläufig auf eine funktionierende Glykolyse angewiesen ist, wohingegen der Laktattransport essentiell zu sein scheint.

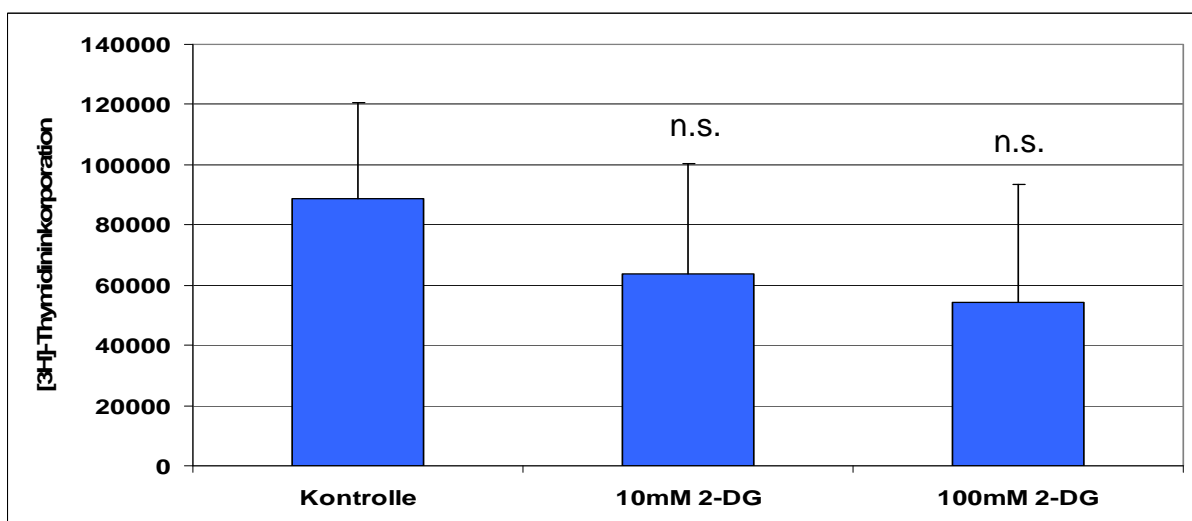


Abb. 19: Hemmung der Proliferation durch 2-DG. Jurkat-T-Zellen wurden für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 30 mM Oxamat bzw. 10 und 100 mM 2-DG inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [3H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ Experimenten (n.s. = nicht signifikant).

Abschließend wurde der Laktatgehalt in Zellüberständen von CTL analysiert. Gegenüber einer Kontrolle ohne Zellen nahmen die Laktatmengen in CTL-Überständen signifikant zu, das bedeutet die CTL produzieren Laktat. Wurde Milchsäure zugegeben, so war mit CTL weniger Laktat detektierbar als in der zellfreien Kontrolle (Abb. 20). Daraus lässt sich schließen, dass Laktat durch T-Zellen aufgenommen wird. Weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe mittels markiertem Laktat bestätigten diese Ergebnisse.

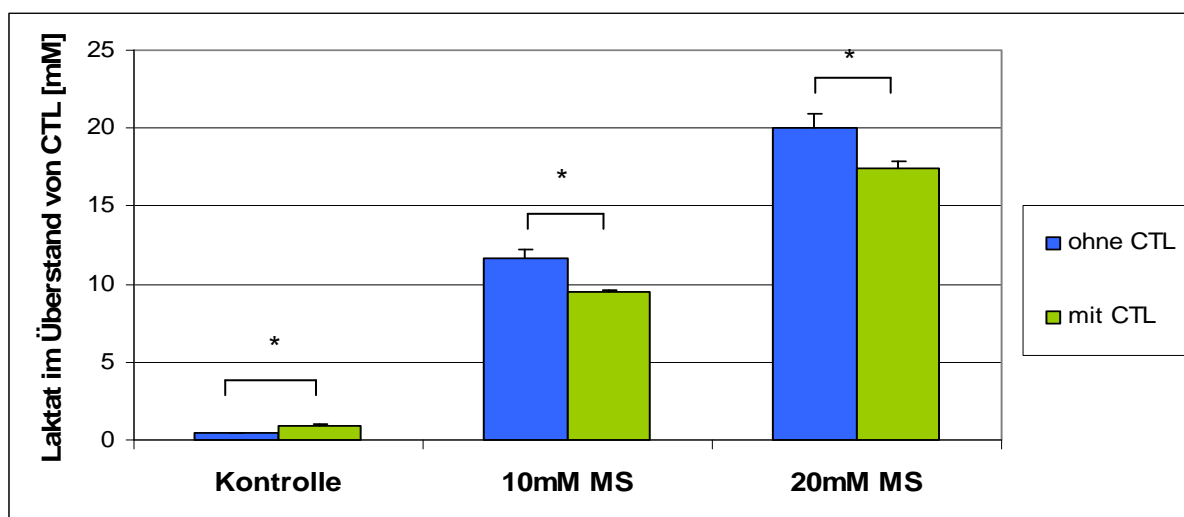


Abb. 20: Laktatbestimmung in CTL-Überständen bzw. zellfreien Ansätzen (ohne CTL). Die Kulturen wurden für 24 Stunden mit bzw. ohne MS inkubiert. Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM (ohne Zellen: $n = 3$; mit Zellen: $n = 3$). (* $p < 0,05$).

3.7 Suppression der Zytokinproduktion durch Milchsäure bei Jurkat-T-Zellen

Um den Wirkmechanismus der Milchsäure auf die Zellproliferation der T-Lymphozyten näher zu untersuchen, wurde analysiert inwieweit die Milchsäure die Produktion von Zytokinen beeinflusst, die für die Zellproliferation und T-Zellantwort wichtig sind. Es wurden Jurkat-T-Zellen mit Milchsäure inkubiert und anschließend mit PMA und Ionomycin stimuliert. Nach RNA-Isolierung aus den behandelten Zellen wurde eine RT-PCR durchgeführt somit ließ sich nachweisen, in welcher Menge Interleukin-2- bzw. Interferon- γ -mRNA von stimulierten Zellen bzw. von einer unstimulierten Kontrollgruppe gebildet wurden.

Interleukin-2 ist das erste Zytokin, das nach Antigenkontakt von der T-Zelle ($CD8^+$ und $CD4^+$) exprimiert wird und autokrin sowie parakrin auf die klonale Expansion der Zellen wirkt. Dabei produzieren ruhende, naive, unstimulierte Zellen kaum IL-2 im Vergleich zu ak-

tivierten, stimulierten T-Zellen. Beim Interferon- γ hingegen handelt es sich um ein Zytokin, das vor allem von CD4-positiven, aktivierten Zellen exprimiert wird.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, führte Milchsäure zu einer signifikanten Hemmung der IL-2-mRNA-Expression. Die unstimulierten Zellen zeigten eine geringere IL-2-mRNA-Expression. Interferon- γ -mRNA konnte in Jurkat-T-Zellen nicht nachgewiesen werden.

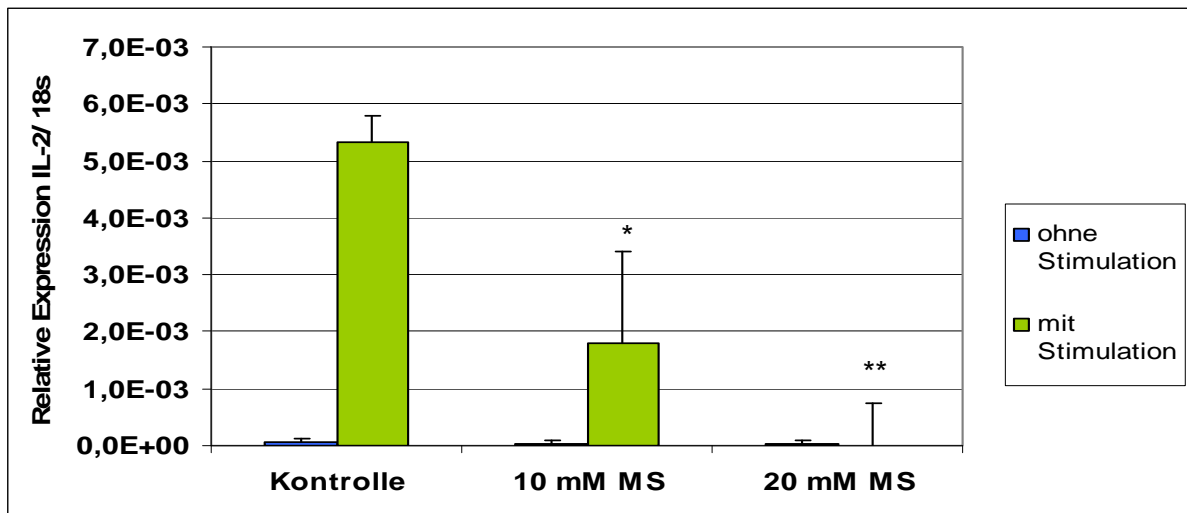


Abb. 21: Interleukin-2-mRNA-Expression in Jurkat-T-Zellen. Die Zellen wurden für 3,5 Stunden mit MS inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin bzw. keine Stimulation über weitere 5 Stunden vor Analyse mittels RT-PCR. Die Werte geben die Expression von IL-2 bezogen auf 18s-Expression in logarithmischer Skalierung an (n = 3). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant).

3.8 IL-2-Bestimmung bei Jurkat-T-Zellen im Zellkulturüberstand mit ELISA

Wir waren interessiert, ob Milchsäure die IL-2-Expression auch auf Proteinlevel regulieren würde. Für die Bestimmung der Menge an Interleukin-2, im Zellüberstand wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet.

Stimulierte Zellen sezernierten ohne Inkubation mit Milchsäure etwa 585 ± 49 U/ml IL-2. 10 mM Milchsäure senkte signifikant die Sekretion von IL-2 auf etwa 160 ± 44 U/ml bzw. bei 20mM hoch signifikant auf einen Wert von nur 5 ± 0 U/ml bei den stimulierten Zellen ab (Abb. 22). Für die unstimulierten Jurkat-T-Zellen ließ sich kein extrazelluläres IL-2 nachweisen.

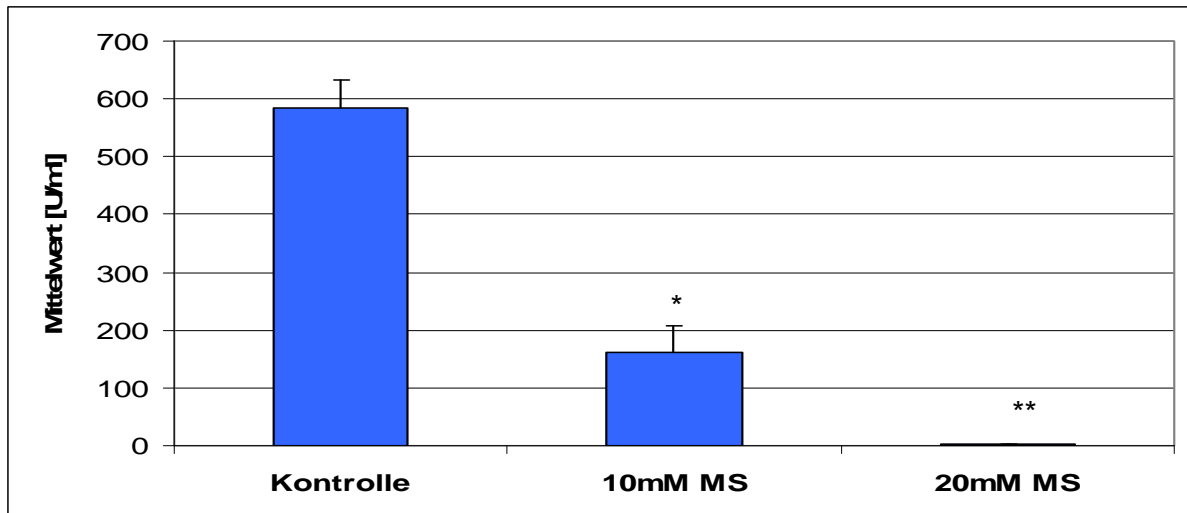


Abb. 22: IL-2-Produktion von Jurkat-T-Zellen im Zellkulturüberstand. Die Zellen wurden für 3,5 Stunden mit MS inkubiert. Es folgte die Stimulation mit PMA und Ionomycin für 5 Stunden vor Bestimmung der IL-2 Menge mittels ELISA im Zellüberstand. Mittelwerte \pm SEM (n = 6). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant).

3.9 Proliferation von Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss von IL-2

Da Interleukin-2 ein wichtiger parakriner Faktor bei der Proliferation von T-Zellen ist, könnte die Inhibition durch Milchsäure eventuell an der Suppression des IL-2 liegen. Daher wurde in einem weiteren Versuch zusätzlich zur Milchsäure Interleukin-2 zugegeben. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Interleukin-2 in einer Konzentration von 100 U/ml in den verschiedenen Milchsäurekonzentrationen inkubiert.

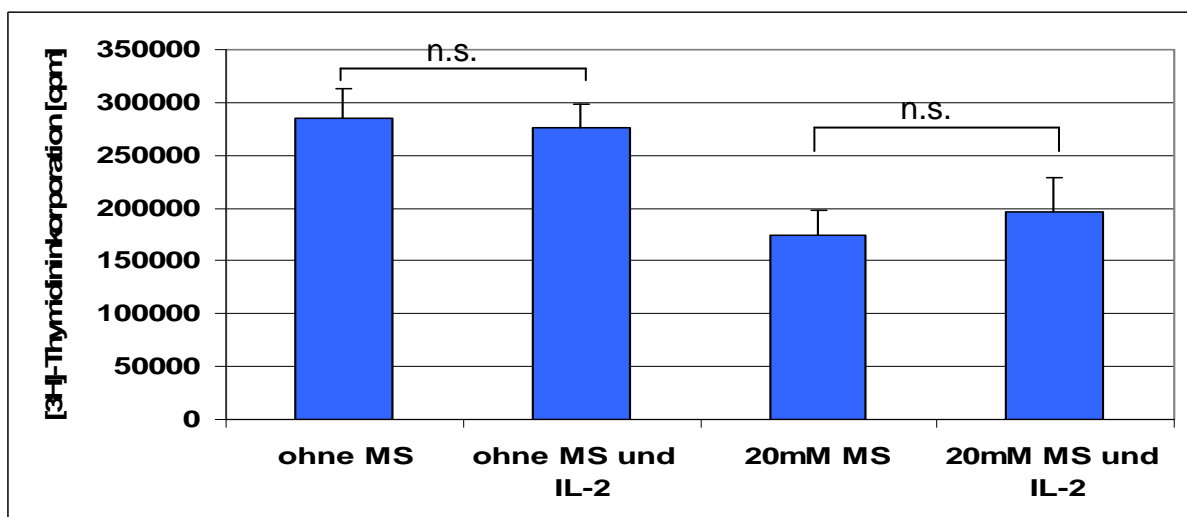


Abb. 23: Bestimmung der Proliferation bei Jurkat-T-Zellen unter dem Einfluss von IL-2. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit bzw. ohne Milchsäure und mit bzw. ohne Zugabe von IL-2 inkubiert. Die Proliferation wurde mittels [^3H]-Thymidininkorporation (cpm) bestimmt. Mittelwerte \pm SEM (n = 3). (n.s. = nicht signifikant).

Jedoch zeigte sich, wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, keine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate.

4. Diskussion

Eine der Hauptaufgaben von tumorspezifischen CD 8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten besteht darin entartete Zellen zu erkennen und abzutöten. Vor dem Hintergrund, dass maligne Erkrankungen weltweit zu den häufigsten Todesursachen gezählt werden wird klar, dass das menschliche Immunsystem es nicht immer schafft Tumore in Schach zu halten oder deren Ausbreitung im Organismus verhindern zu können. Tumore haben verschiedene Mechanismen entwickelt um dem Angriff des Immunsystems zu entgehen. Zudem konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, wie der spezifische Metabolismus der Tumorzelle bzw. seine Metabolite einen starken Einfluss auf Immunzellen ausüben und die Immunzellen in einen anergen Zustand versetzt.

Bereits vor über 70 Jahren konnte Otto Warburg (Warburg et al., 1924) eine generell gesteigerte Glykolyse in Tumorzellen zeigen. Dieses als „Warburg Effekt“ bezeichnete Phänomen ist eine wichtige Veränderung im Metabolismus entarteter Zellen und führt zur Sekretion des glykolytischen Endproduktes Laktat. Die Mechanismen, die in Tumorzellen zur gesteigerten Glykolyse führen sind ziemlich komplex. Es handelt sich dabei v. a. um mitochondriale Funktionsstörungen, Adaptation der Tumorzellen an Hypoxie, onkogene Signale und die abnorme Expression von bestimmten metabolischen Enzymen (Pelicano et al., 2006). In Folge resultieren maligne Zellen, die sich an glykolytische Energiegewinnung und an assoziiertes hypoxisches Milieu anpassen und sogar in gewisser Weise davon abhängig werden. Tumorzellen werden somit empfindlich für Glykolyseinhibitoren (Gatenby und Gillies, 2004). In der Literatur wurden bereits gezeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen bestimmte Zellen erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Glykolyseinhibitoren wie z.B. Oxamat, 3-Bromopyruvat oder 2-Deoxyglukose aufwiesen (Liu et al., 2002; Mahler et al., 2004).

Die Hypoxie, führt im Tumorgewebe wie angedeutet zur Hochregulation von Glukosetransportern (z.B. GLUT-1) und glykolytischen Enzymen (z.B. LDH). Zudem konnte in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt werden, dass eine hohe Laktatkonzentration bzw. Expression von LDH sowie GLUT-1 im Tumor mit einer schlechten Prognose der betroffenen Patienten korreliert (Walenta et al., 2000 und 2004; Koukourakis et al., 2003 und 2006).

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese war daher, dass der Metabolit der in Tumorzellen verstärkt ablaufenden Glykolyse, Laktat bzw. Milchsäure, einen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen hat. Untersucht wurde inwieweit sich Melan-A-spezifische, humane zytotoxische T-Zellen im Vergleich zu entarteten T-Zellen (Jurkat-T-Zellen) in Wachstum,

Apoptoseinduktion, Oberflächentransporter- oder Wachstumsfaktorexpression durch Milchsäure beeinflussen lassen.

4.1 Effekte der Milchsäure auf die T-Zelle

4.1.1. Einfluss von Milchsäure auf das Proliferationsverhalten von CD8⁺ T-Lymphozyten, Jurkat-T-Zellen und CD4⁺ T-Lymphozyten

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Melan-A-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) als auch Zellen der entarteten T-Zellreihe Jurkat in Abhängigkeit von der eingesetzten Milchsäurekonzentration in ihrer Proliferation hemmen lassen. Mit der Akkumulation von Milchsäure ist ein Absinken des pH-Wertes verbunden, daher erfolgte analog die Untersuchung der Zellproliferation bei einem pH von 6,5. Dabei konnte man im langen Zeitintervall (24 Stunden) die zunehmende inhibierende Wirkung von H⁺-Ionen beobachten, während im Kurzzeitversuch über 6,5 Stunden keine signifikante Hemmung der Proliferation durch Ansäuerung feststellbar war. Untersuchungen zur Reversibilität des beobachteten Milchsäureeffektes zeigten für CTL und Jurkat-T-Zellen nach Entfernen der Milchsäure keine erneute Zunahme der Zellproliferation. Auch in weiteren Proliferationsversuchen mit CFSE über ein Intervall von 3 Tagen konnte ein signifikant hemmender Effekt unter dem Einfluss von Milchsäure verzeichnet werden. Laktationen an sich zeigten verglichen mit Milchsäure in gleicher Konzentration (20 mM) einen deutlich abgeschwächten Effekt.

In Anlehnung an die physiologische Situation des Immunsystems erfolgten Versuche im Rahmen der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR), wobei naive T-Lymphozyten mit reifen dendritischen Zellen (mDCs) inkubiert wurden. Die beobachtete Proliferationshemmung der eingesetzten naiven CD 4-positiven T-Lymphozyten mit zunehmender Milchsäurekonzentration bestätigte ergänzend unsere Vermutung eines inhibierenden Milchsäure-Effektes auf T-Lymphozyten.

Untersuchungen von Mihm et al. (1985) zeigen ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf T-Zellen. Hierbei führte eine *in vivo*-Gabe von L-Laktat, dem Salz der Milchsäure bei CTL zu einer Herunterregulation der zytotoxischen Aktivität. Eine Hemmung von Chemotaxis, respiratorischer Aktivität und bakterizider Kapazität von Lymphozyten in Tumorsphäroiden wurde bei Lardner et al. beschrieben (2001). Die Beeinträchtigung der Zytotoxizität der Zellen wurde hierbei auf das saure Milieu zurückgeführt. Auch in anderen Arbeiten konnte der inhibierende Effekt eines erniedrigten pH-Wertes auf Makrophagen und Leukozyten bereits gezeigt werden (Swallow et al., 1991; Grinstein et al., 1991; Hackam et al., 1996).

4.1.2 Einfluss von Milchsäure auf die Apoptoseinduktion bei CD8⁺ T-Lymphozyten und Jurkat-T-Zellen

In unserem Langzeit-Versuch über 24 Stunden hatte der pH-Wert (~ 6,5) ebenso wie eine Milchsäurekonzentration von 10 mM keinen Einfluss auf die Apoptose der eingesetzten CTL bzw. Jurkat-T-Zellen. Bei einer Milchsäurekonzentration von 20 mM wird Apoptose induziert. Daher kann man nicht ausschließen, dass dies ein Mechanismus der Proliferationshemmung bei hohen Milchsäurekonzentrationen darstellt.

Andere Arbeiten zeigen, dass bereits eine extrazelluläre pH-Senkung Apoptose induzieren kann (Li and Eastmann, 1995). Dies hängt u. a. mit einer intrazellulären Ansäuerung und dadurch Aktivierung bestimmter Deoxyribonukleasen zusammen (Barry and Eastmann, 1993). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Milchsäure auch bei CTL zu einer starken intrazellulären Ansäuerung der T-Zellen führt. Daher könnte die intrazelluläre Ansäuerung einen Mechanismus der Apoptoseinduktion darstellen.

4.1.3 Einfluss von Milchsäure auf die Zytokinproduktion von Jurkat-T-Zellen

Zytokine beeinflussen wesentlich Wachstum, Aktivität und Funktion von Lymphozyten. Besondere Bedeutung haben hierbei die sogenannten Interleukine, die als Peptidhormone wichtige Prozesse des Immunsystems und insbesondere der Lymphozyten regulieren. Interleukine regen also spezifisch Zellen des Immunsystems zu Wachstum, Reifung und Teilung an oder verhindern genau diese Prozesse. Interleukin-2 stellt dabei einen der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die T-Lymphozyten dar (Gordon et al., 1985). Eine vermehrte Ausschüttung wird durch T-Zellaktivierung v. a. von CD4-positiven T-Helferzellen verursacht und führt neben vorrangiger autokriner T-Zellaktivierung zur Aktivierung von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen.

Unter dem Einfluss von Milchsäure konnten wir eine deutliche Reduktion der Interleukin-2-Produktion von Jurkat-T-Zellen auf mRNA- und Proteinebene zeigen. Allerdings konnte aber durch Zugabe von Interleukin-2 zum Milchsäuremilieu keine signifikante Steigerung der Zellproliferation beobachtet werden. Daher stellte die Hemmung der IL-2-Sekretion wohl keinen Mechanismus der Hemmung durch Milchsäure dar.

Im Gegensatz zu unseren Experimenten zeigen Untersuchungen von Roth und Droge (1991), dass eine hohe extrazelluläre Laktatkonzentration die Produktion des Wachstumsfaktors Interleukin-2 von CD4-positiven Zellen steigert, woraus bei diesen Immunzellen eine vermehrte Zellaktivität resultierte. Analog untersuchte CD8-positive Zellen wurden nicht beeinflusst.

Allerdings wurde hierbei nicht Milchsäure sondern das Laktatanion untersucht, wodurch die Diskrepanz erklärbar ist. Auch bei uns trat bei Verwendung von Na^+ -Laktat kein bzw. nur ein verminderter Effekt auf. Eine Steigerung von IL-17 durch Laktat wurde in einer Arbeit von Shime et al. (2008) gezeigt.

4.2 Mechanismus des Milchsäureeffektes

Dass zytotoxische T-Lymphozyten relativ empfindlich auf die Zugabe von extrazellulärer Milchsäure reagieren, hängt vermutlich mit der Umstellung des Metabolismus während der T-Zellaktivierung zusammen. Aktivierte CD8-positive T-Lymphozyten sind in der Lage im Rahmen einer raschen Energiegewinnung ihren Metabolismus auf Glykolyse umzustellen, wobei jedoch vermehrt intrazellulär Milchsäure anfällt (Frauwirth et al., 2004). Um jedoch eine hohe Glykolyserate aufrecht erhalten zu können muss die anfallende Milchsäure aus der Zelle transportiert werden (Tilton et al., 1991). Essentiell für den raschen und effizienten Transport von Laktat über die Plasmamembran sind Monocarboxylattransporter (MCT). Diese sind von zentraler Bedeutung für „glykolytische Zellen“ (z. B. weiße Muskelzelle, Tumorzelle), die schnell große Mengen an Milchsäure aus der Zelle transportieren müssen.

Die bidirektionalen MCTs entfernen in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten über der Plasmamembran ein Laktatmolekül zusammen mit einem Proton aus der Zelle (Halestrap et al., 1999). In der Literatur konnten Monocarboxylattransporter v. a. der Klasse MCT-1, -2 und -4 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden (Merezhinskaya et al., 2004). Durchflusszytometrisch war in unseren Experimenten keine MCT-1-Expression auf CTL und kaum auf Jurkat-T-Zellen nachweisbar. Im Western Blot war MCT-1 gut auf CTL nachweisbar, aber kaum auf ruhenden CD8-positiven Zellen. Die Hochregulation von MCT-1 nach Zellaktivierung deutet auf eine wichtige Funktion für die Zelle hin. Entsprechend konnte Murray et al. (2005) zeigen, dass v. a. das MCT-1-Molekül einen bedeutenden Angriffspunkt von immunsuppressiven Therapien darstellt, die das Wachstum von T-Lymphozyten durch die indirekte Blockade der Glykolyse hemmen.

Der MCT-1-abhängige Abtransport von Milchsäure aus der Zelle kann auch durch Zimtsäure (α -Cyano-4-Hydroxycinnamat, CINN) gestört werden. Zimtsäure hemmt den Monocarboxylattransporter-1 (MCT-1) von Lymphozyten (Dimmer et al., 2000; McClelland, 2003; Samuel et al., 2009). Wir konnten in unseren Versuchen eine signifikante Inhibition der Laktatsekretion unter dem Einfluss von Zimtsäure bei Jurkat-T-Zellen nachweisen. Dies führte außerdem zu einer Hemmung der Zellen. Somit wurde die wichtige Rolle des Laktatexports bzw.

der Glykolyse für die T-Zellaktivierung unterstrichen. Entsprechend führte eine hohe extrazelluläre Laktatkonzentration zu einer Aufnahme von Laktat in die T-Zelle. Dies kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass durch die hohe extrazelluläre Konzentration von Laktat der Gradient umgekehrt wird und der MCT daher Laktat entgegen dem Gradienten von außen nach innen transportiert.

Aufgenommenes Laktat sowie Protonen hemmen u. a. Enzyme der Glykolyse. Eine mögliche Erklärung für die Proliferationshemmung der CTL durch Laktat liefern dabei die Resultate einer spanischen Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass Laktat eines der Schlüsselenzyme für die glykolytische Energiegewinnung hemmt, die 6-Phosphofruktokinase (PFK). Das Salz der Milchsäure setzt dabei die Affinität wichtiger Enzymsubstrate (z.B. ATP) entscheidend herab (Costa Leite et al., 2007). Da die Glykolyse eine entscheidende Bedeutung für die T-Zellaktivität hat, kommt es durch die Hemmung der Glykolyse zur Inhibition von Proliferation und Zytokinsekretion.

Entsprechend untersuchten wir in weiteren Experimenten mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose inwieweit das Proliferationsverhalten von Jurkat-T-Zellen wirklich von der Energiegewinnung durch Glykolyse abhängig ist. Das Glukoseanalogon 2-DG wird nach seiner Aufnahme in die Zelle durch Hexokinase zu 2-Deoxyglukosephosphat phosphoryliert, es kann jedoch nicht weiter durch die physiologischen Enzyme metabolisiert werden. Daher resultiert eine indirekte Blockade der Glykolyse. Die Hemmung dieses enzymatisch wichtigen Schrittes führt über einen Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) zur Wachstumsblockade und sogar zum Zelltod *in vitro* (Mahler et al., 2004).

In den Zellüberständen ergaben sich indirekt proportional sinkende signifikante Laktatkonzentrationen für eine Konzentration von 100 mM 2-DG, was einen möglichen Zusammenhang mit der Inhibition der Glykolyse vermuten lässt. Wir konnten dann mit zunehmender 2-DG-Konzentration eine schwache Wachstumshemmung der eingesetzten Jurkat-T-Zellen beobachten, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Im Gegensatz hierzu fanden Cham et al. (2008) starke Effekte von DG auf die Aktivität von CD8-Zellen.

Die Diskrepanz lässt sich evtl. mit dem Unterschied zwischen primären Zellen und Jurkat erklären. Tumorzellen sind weniger sensitiv als normale Zellen.

5. Zusammenfassung

Obgleich eine der Hauptaufgaben des erworbenen Immunsystems, insbesondere der zytotoxischen T-Lymphozyten die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen ist, gehören maligne Erkrankungen zu den drei häufigsten Todesursachen unserer westlichen Gesellschaft. Es ist nachgewiesen, dass im Tumorgewebe durch einen hohen glykolytischen Metabolismus ein Milieu mit niedrigem pH-Wert und hoher Milchsäurekonzentration herrscht. Bei humanen dendritischen Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass diese in ihrer Fähigkeit der Antigenpräsentation unter dem Einfluss von Milchsäure *in vitro* gehemmt werden. In der vorliegenden Arbeit beschäftigte uns der Effekt des Tumormilieus auf T-Lymphozyten als zentrale Effektorzellen einer Immunantwort im Tumor. Zielsetzung war es, die Effekte der Milchsäure auf antigenspezifische CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und CD4-positive Jurkat-T-Zellen näher zu untersuchen.

Humane Melan A-spezifische CTL und Jurkat-T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Milchsäure (MS) inkubiert. Sowohl für CTL als auch für Jurkat-T-Zellen ergab sich mit zunehmender MS-Konzentration eine signifikante Proliferationshemmung der Zellen. In ergänzenden Proliferationsversuchen mit einer CFSE-Färbung über 3 Tage konnte gezeigt werden, dass Natrium-Laktat, das Natrium-Salz der Milchsäure einen abgeschwächten Effekt auf das Zellwachstum zeigt im Vergleich zu Milchsäure in gleicher Konzentration. Analysen zur Reversibilität des MS-Effektes erbrachten keinen Hinweis auf eine erneute Proliferation der T-Zellen.

Bei Untersuchungen zum Apoptoseverhalten von T-Lymphozyten war ein zunehmender Zellverlust mit steigender MS-Konzentration zu beobachten. Erwartungsgemäß tolerierten Jurkat-T-Zellen höhere Konzentrationen an MS als CTL. Dies lässt vermuten, dass unter dem Einfluss höherer Konzentrationen an Milchsäure die beobachtete Proliferationshemmung auf einem zunehmenden Zellverlust an T-Lymphozyten beruht.

In Anlehnung an die physiologische Situation wurde mit humanen dendritischen Zellen (DC) und allogenen T-Lymphozyten eine gemischte Lymphozytenreaktion über 7 Tage unter dem Einfluss von Milchsäure durchgeführt. Auch die CD4-positiven T-Lymphozyten zeigten eine signifikante Wachstumshemmung unter dem Einfluss von Milchsäure.

T-Lymphozyten bedienen sich während ihrer Aktivierung aufgrund eines massiv gesteigerten Energiebedarf der Glykolyse. Der anfallende Metabolit Laktat bzw. Milchsäure muss aus der Zelle transportiert werden, um eine Ansäuerung zu verhindern. Für den Abtransport der Anionen besitzt die T-Zelle Monocarboxylattransporter (MCT), die einen gradientenabhängigen

Transport über die Plasmamembran gewährleisten. MCT waren durchflusszytometrisch auf Jurkat-T-Zellen nur gering und auf CTL gar nicht nachweisbar. Im Western Blot allerdings gelang auch der Nachweis von MCT-1 und MCT-2 auf CTL. Ergänzend erfolgten Versuche zum Einfluss des Glykolyseinhibitors 2-Deoxyglucose (2-DG). Obgleich unter dem Effekt von 2-DG der MS-Gehalt in den Zellüberständen der T-Lymphozyten abnahm, zeigte sich für die eingesetzten Jurkat-T-Zellen keine statistisch signifikante Wachstumshemmung.

Zudem wurden Analysen zur Zellproliferation unter dem Einfluss von Zimtsäure (CINN) durchgeführt. Bei CINN handelt es sich um einen MCT-Inhibitor. Der gradientenbedingte Abtransport von Laktat über die Plasmamembran wird hierdurch empfindlich gestört und es resultiert eine intrazelluläre Akkumulation an MS. Es konnte gezeigt werden, dass aus einer steigenden MS-Konzentration im Zellüberstand aufgrund einer Gradientenumkehr eine MS-Aufnahme in die Zelle resultiert. Unter dem Einfluss von CINN war eine signifikante Reduktion an MS im Zellüberstand sowie eine signifikante Wachstumshemmung der T-Zellen zu beobachten.

Untersuchungen zum Einfluss von Interleukin-2 (IL-2), einem wichtigen Zytokin für die Interaktion und Aktivierung der T-Zelle ergaben auf mRNA- und Proteinebene eine signifikant supprimierte Expression. Analysen zum Umkehrschluss, dass unter Zugabe von IL-2 eine Proliferationssteigerung unter dem Effekt von MS resultieren würde, bestätigten sich nicht.

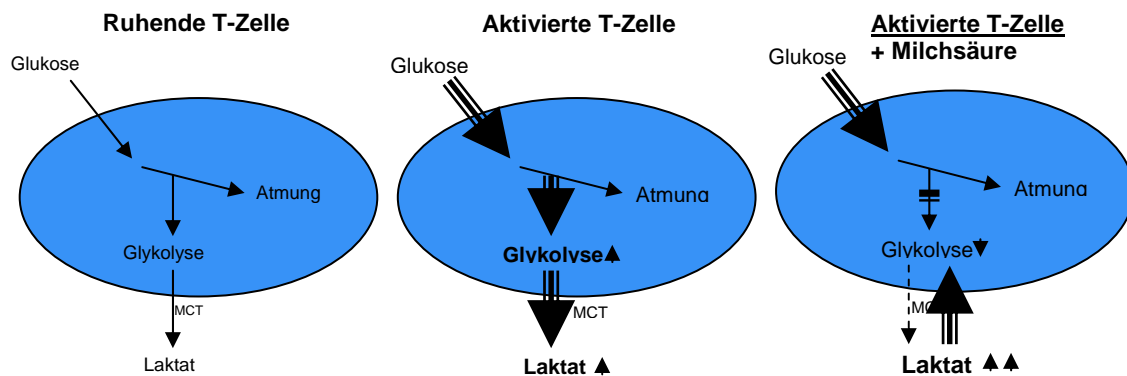


Abb. 24: Im Gegensatz zur ruhenden T-Zelle bei der nur wenig Laktat als Folge der geringen Glykolyse anfällt, kommt es bei der Aktivierung der T-Zelle aufgrund des gesteigerten Energiebedarfs zur verstärkten Glykolyse mit einer größeren Menge des Metabolit Laktat. Das anfallende Laktat wird über MCT gradientenabhängig über die Plasmamembran aus der Zelle transportiert. Im Tumormilieu kommt es bei gesteigerter Glykolyse der Tumorzellen („Warburg Effekt“) zur extrazellulären Akkumulation von Laktat. Trotz gesteigerter Glykolyse der aktivierten T-Zelle resultiert eine Laktataufnahme in die T-Zelle durch die MCT in Abhängigkeit des Konzentrationsgradienten.

Es ist bekannt, dass durch gesteigerte Glykolyse im Tumorgewebe große Mengen an extrazellulärem Stoffwechselendprodukt Milchsäure bzw. Laktat anfällt. Die MCT der T-Lymphozyten sind wahrscheinlich bei steigender extrazellulären Milchsäurekonzentration nicht mehr im Stande anfallendes Laktat ausreichend aus der Zelle zu schleusen, wodurch eine Blockade in den für die T-Zellaktivierung wichtigen metabolischen Prozessen der Glykolyse stattfindet und die Immunzellen entscheidend in ihrem Verhalten gehemmt werden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein hoher Laktatgehalt im Tumormilieu den Abtransport von MS aus der T-Zelle blockiert. Hieraus resultiert eine Hemmung der Proliferation sowie der Zytokinproduktion und begünstigt die Apoptose von T-Lymphozyten. Strategien, diese metabolischen Mechanismen zu umgehen könnten helfen in Zukunft Tumoren mit einer wirksamen immunologischen Therapie zu bekämpfen.

7. Literaturverzeichnis

Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. 1993; 300: 440-450.

Biswas K, Richmond A, Rayman P. GM2 expression in renal cell carcinoma: potential role in tumor-induced T-cell dysfunction. Cancer Res. 2006; 66: 6816-6825.

Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. Current Opinion in Immunology. 2005; 17:180-186.

Boyer MJ, Tannock IF. Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. Cancer Res. 1992; 52:4441-4447.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation.. Essays Biochem. 2007; 43: 165–178.

Brizel DM, Schroeder T, Scher RL et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. Int J Rad Oncol Biol Phys. 2001; 51:349-353.

Bronte V, Kasic T, Gri G. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. JEM. 2005; 201: 1257-1268.

Caldwell S, Heitger A, Shen W. Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. J Immunol. 2003; 171: 1676-1683.

Cham CM, Gajewski TF. Glucose availability regulates IFN- γ production and p70S6 kinase activation in CD8+ effector T cells. J Immunol. 2005; 174:4670-4677.

Cham CM, Driessens G, Keefe JP, Gajewski TF. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. Eur J Immunol. 2008; 38: 2438-2450.

Cheung HH, Arora V, Korneluk RG. Abnormalities of cell structures in tumors: apoptosis in tumors. *Cancer: Cell structures, carcinogens and genomic instability*. Birkhäuser Verlag/ Switzerland; 2006; 201-215.

Costa Leite T, Da Silva D, Guimaraes Coelho R et al. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J*. 2007; 408: 123-130.

Dai Y, Xu M, Wang Y et al. HIF-1 α induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42: 1036-1044.

Demanet C, Mulder A, Deneys V et al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*. 2004; 103:3122-3130.

Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylase transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J*. 2000; 350 Pt 1:219-227.

Droge W, Roth S, Almann A, Mihm S. Regulation of T-cell functions by L-lactate. *Cell Immunol*. 1987; 108:405-416.

Fischer K, Andreesen R, Mackensen A. An improved flux cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods*. 2002; 259:159-169.

Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S et al. Inhibitory effect of tumor cell derived lactic acid on human T cells. *Blood*; 2007; 1; 109(9):3812-9.

Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol*. 2004; 172:4661-4665.

Gabenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:891-899.

Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol.* 2004; 31: 303-308.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:891-899.

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006; 107:2013-2021.

Grinstein S, Swallow CJ, Rotstein OD. Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction. *Clin Biochem.* 1991; 24: 241-247.

Hackam DJ, Grinstein S, Rotstein OD. Intracellular pH regulation in leukocytes: mechanisms and functional significance. *Shock.* 1996; 5: 17-21.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 1999; 343: Pt 2:281-299.

Hedekov CJ, Esmann V. Respiration and glycolysis of normal human lymphocytes. *Blood.* 1966; 28:163-174.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* 2006; 66:632-637.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C et al. Laccate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin & Experiment Metastasis.* 2005; 22: 25-30.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway – A report of the tumour angiogenesis research group. *J Clin Oncol.* 2006; 24:4301-4308.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer*. 2003; 89:877-885.

Ladisch S, Wu ZL, Feig S. Shedding of GD1 ganglioside by human neuroblastoma. *Int J Cancer*. 1987; 39: 73-76.

Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol*. 2001; 69: 522-530.

Lauc G, Lauc MH. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2006; 1760: 584-602.

Li J, Eastmann A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na(+)/H(+)-antiport. *J Biol Chem*. 1995; 270: 3203-3211.

Liu H, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ. Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: a strategy for solid tumor therapy (Model C). *Biochem Pharmacol*. 2002; 64: 1745-1751.

Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004; 53: 116-122.

Maraveyas A, Hrouda D, Dalglish AG. Tumour immunology. *Molecular Aspects of Cancer and its Therapy*. 1998; Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland; 73-83.

McClelland GB, Khanna S, González GF, Butz CE, Brooks GA. Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system?. *Biochem Biophys Res Comm* 304. 2003; 130-135.

Merezhinskaya N, Ogunwuyi SA, Mullick FG, Fishbein WN. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT -1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes and monocytes. J Histochem Cytochem. 2004; 52:1483-1493.

Mihm S, Droge W. Regulation of cytotoxic T-lymphocyte activation by L-lactate and pyruvate. Cell Immunol. 1985; 96: 235-240.

Mills GB, Cragoe EJ, Gelfand EW, Grinstein S. Interleukin 2 induces a rapid increase in intracellular pH through activation of a Na⁺/ H⁺ antiport. J Biol Chem. 1985; 260:12500-12507.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science. 2002; 297: 1867-1870.

Murray CM, Hutchinson R, Bantick JR et al. Monocarboxylate transporter MCT 1 is a target for immunosuppression. Nat Chem Biol. 2005; 1:371-376.

Nguyen XC, Eichler H, Dugrillon A et al. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. J Immunol Methods. 2003; 275:57-68.

Overwijk WW. Breaking tolerance in cancer immunotherapy: time to act. Curr Opinion Immunol. 2005; 17:187-194.

Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. Oncogene. 2006; 25: 4633-4646.

Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. Am J Physiol. 1993; 264: C761-C782.

Roth S, Droge W. Regulation of interleukin 2 production, interleukin 2 mRNA expression and intracellular glutathione levels in *ex vivo* derived T lymphocytes by lactate. Eur J Immunol. 1992; 21:1933-1937.

Samuvel DJ, Sundararaj KP, Nareika A et al. Lactate boosts TLR-4 signaling and NF- κ B pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *J Immunol.* 2009; 182: 2476-2484.

Seam P et al. The role of FDG-PET scans in patients with lymphome. *Blood.* 2007; Vol. 110. *Semin Oncol* 2004 Apr;31(2 Suppl 7):2-11.

Shim H, Dolde C, Lewis BC et al. c-myc transactivation of LDH-A: implication for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 6658-6663.

Shime H, Yabu M, Akazawa T et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol.* 208; 180: 7175-7183.

Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A. Intratumoral cytokines / chemokines /growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 333-356.

Sietsma H, Nijhof W, Dontje B. Inhibition of hemopoiesis in vitro by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Res.* 1998; 58: 4840-4844.

Steinmann L. A brief history of T_H17, the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine.* 2007; 13: 139-145.

Swallow CJ, Grinstein S, Sudsbury RA, Rotstein OD. Cytoplasmic pH regulation in monocytes and macrophages: mechanism and functional implications. *Clin Invest Med.* 1991; 14: 367-378.

Tilton WM, Seaman C, Carrierio D, Piomelli S. Regulation of glycolysis in the erythrocyte: role of the lactate/ pyruvate and NAD/ NADH ratios. *J Lab Clin Med.* 1991; 118:146-152.

Tsao N, Lei HY. Activation of the Na(+)/H(+) antiporter, Na(+)/HCO₃(-)/CO₃(2-) co-transporter or Cl(-)/HCO₃(-) exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis. *J Immunol.* 1996; 157: 1107-1116.

Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2006; 281:9030-9037.

Uyttenhove C, Pilott L, Théate I. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-deoxygenase. *Nature.* 2003; 9: 1269-1275.

Volk T, Jaehde E, Fortmeyer HP, Gluesenkamp KH, Rajewsky MF. pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer.* 1993; 68:492-500.

Wahl ML, Owen JA, Burd R et al. Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 2002; 1:617-628.

Walenta S, Mueller-Klieser WF. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in Radiation Oncology.* 2004; 14: 267-274.

Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem.* 2004; 11:2195-2204.

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000; 60:916-921.

Warburg O. On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy. *Munch Med Wochenschr.* 1961; 103:2504-2506.

Wittekind C, Neid M. Cancer Invasion and Metastasis. *Oncology.* 2005; 69: 14-16.

Xu R-H, Pelicano H, Zhou Y et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005; 65: 613-612.

Yin J, Hashimoto A, Izawa M. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 2937-2945.

Zippelius A, Batard P, Rubio-Godoy V et al. Effector function of human tumor-specific CD 8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res.* 2004; 64:2865-2873.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zu aller erst Prof. Dr. rer. nat. Marina Kreutz für die intensive, fachkundige und geduldige Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen, dem Leiter der Abteilung Hämatologie und internistische Onkologie für die Ermöglichung der Forschungsarbeit.

Für die zahlreichen Erklärungen und Hilfestellungen, die für die Durchführung meiner Experimente erforderlich waren, bedanke ich mich herzlich bei den Mitarbeitern des Labors v. a. bei Dr. rer. nat. Karin Fischer, Dr. rer. nat. Simon Völkl, Alice Peuker, Alexandra Müller und Claudia Reichelt-Busch. Nicht zu vergessen Eva Gottfried für mehrfaches sachkundiges und kritisches Lesen des Manuskripts.

Ein großes Dankeschön auch an meine Familie, insbesondere an meine Eltern Elisabeth und Paul und an meinen Mann Stefan. Für die vielen motivierenden Worte, das Gegenlesen der Arbeit und generell für die stetig motivierende Unterstützung über die ganzen Jahre.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Ammer
Anschrift	Alte Nürnberger Str. 4a 93059 Regensburg Tel.: (09 41) 8 90 52 60 Mobil: (01 71) 2 46 93 92 E-mail: Julia.Ammer@klinik.uni-regensburg.de
Geburtsdatum	4. Januar 1981
Geburtsort	Passau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schule

09/87 bis 08/93	Grundschule Osterhofen.
09/93 bis 08/97	Realschule Damenstift. Abschluss: mittlere Reife.
09/97 bis 08/98	Übertrittsklasse des staatlichen Gymnasiums Pfarrkirchen.
09/98 bis 08/99	Comenius-Gymnasium Deggendorf.
09/99 bis 08/01	St.-Gotthardt-Gymnasium Niederalteich. Abschluss: Abitur.

Studium der Humanmedizin

10/01 bis 07/03	Vorklinischer Abschnitt an der Universität Regensburg. Abschluss: Physikum.
10/03 bis 07/06	Klinischer Abschnitt am Klinikum der Universität Regensburg.
Seit 08/06	Praktisches Jahr an der Universität Regensburg: <ul style="list-style-type: none">▪ Innere Medizin, Klinikum der Universität Regensburg.▪ Chirurgie, Klinikum der Universität Regensburg.▪ Gynäkologie, Krankenhaus St.-Josef, Regensburg.

Famulaturen

02/04 bis 03/04	Abteilung der Inneren Medizin, Krankenhaus Vilshofen.
08/04	Abteilung für Chirurgie, Krankenhaus Eggenfelden.
07/05 bis 08/05	Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Krankenhaus Eggenfelden. Abteilung für Innere Medizin, Krankenhaus Eggenfelden.
02/06 bis 03/06	allgemeine Hausarztpraxis Dr. Franz Irber, Osterhofen.

Berufsausbildung

Seit 01/08	Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie/ Internistische Onkologie, Uniklinikum Regensburg.
------------	---

Kenntnisse und Fertigkeiten**Sprachkenntnisse**

Englisch	gute Kenntnisse
Französisch	gute Kenntnisse

Zusatzqualifikationen

04/05 bis 09/05	Propädeutik der Akupunktur Teil 1, Dr. D. Irnich.
10/05 bis 03/06	Propädeutik der Akupunktur Teil 2, Dr. D. Irnich.

Sonstige Interessen

Reiten	1988 bis 1999 Mitglied im Reit- und Fahrverein Moos e. V.
Querflöte	1996 bis 2001 Mitglied des Niederalteicher Flötenensembles; 2002 bis 2005 Mitglied des Niederbayerischen Ärzteorchesters

Regensburg, 28.10.2009

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Julia Ammer